

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUS VECTORS AND USE THEREOF IN GENE THERAPY

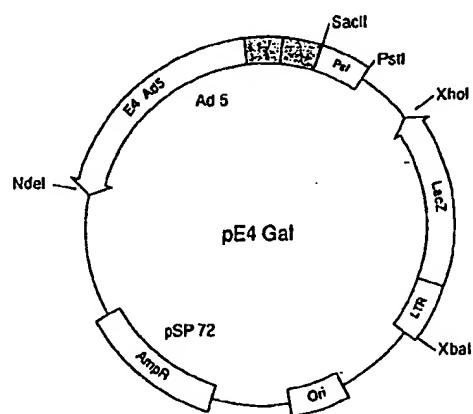
(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRaux DEFECTIFS ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

(57) Abstract

Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and the use thereof in gene therapy, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique.

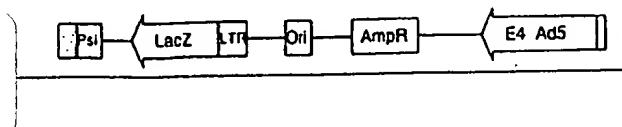


x

H2d1808

↓

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 7639-061
SERIAL NUMBER: 08/333,680
REFERENCE: AT



Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

VECTEURS ADENOVIRaux DEFECTIFS ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques contenant lesdits vecteurs viraux. Plus particulièrement, la présente invention concerne des adénovirus recombinants comme vecteurs pour la thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anormalité (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit 5 in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Viro. 1 10 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, 15 l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations 20 cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de 25 la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à leur extrémité, une séquence d'encapsidation, des gènes précoces et des gènes tardifs 30 (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont les gènes E1 (E1a et E1b), E2, E3 et E4. Les principaux gènes tardifs sont les gènes L1 à L5.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, ceux-ci

ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes *in vivo*. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes (β -gal, OTC, α -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de réplication dans la cellule infectée. Ainsi, les 5 constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus déletés des régions E1 (E1a et/ou E1b) et éventuellement E3 au niveau desquelles sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Néanmoins, les vecteurs décrits dans l'art antérieur présentent de nombreux inconvénients qui limitent leur exploitation en thérapie génique. En 10 particulier, tous ces vecteurs comportent de nombreux gènes viraux dont l'expression *in vivo* n'est pas souhaitable dans le cadre d'une thérapie génique. De plus, ces vecteurs ne permettent pas l'incorporation de fragments d'ADN de très grande taille, qui peuvent être nécessaires pour certaines applications.

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente 15 invention décrit en effet des adénovirus recombinants pour la thérapie génique, capables de transférer de manière efficace de l'ADN (jusqu'à 30 kb) *in vivo*, d'exprimer à des niveaux élevés et de manière stable cet ADN *in vivo*, en limitant tout risque de production de protéines virales, de transmission du virus, de pathogénicité, etc. En particulier, il a été trouvé qu'il est possible de réduire considérablement la taille du 20 génome de l'adénovirus, sans empêcher la formation d'une particule virale encapsidée. Ceci est surprenant dans la mesure où il avait été observé dans le cas d'autres virus, par exemple des rétrovirus, que certaines séquences distribuées le long du génome étaient nécessaires pour une encapsidation efficace des particules virales. De ce fait, la réalisation de vecteurs possédant d'importantes déletions internes était fortement 25 limitée. La présente invention montre également que la suppression de l'essentiel des gènes viraux n'empêche pas non plus la formation d'une telle particule virale. De plus, les adénovirus recombinants ainsi obtenus conservent, en dépit des modifications importantes de leur structure génomique, leurs propriétés avantageuses de fort pouvoir infectieux, de stabilité *in vivo*, etc.

30 Les vecteurs de l'invention sont particulièrement avantageux puisqu'ils permettent l'incorporation de séquences d'ADN désirées de très grande taille. Il est ainsi possible d'insérer un gène d'une longueur supérieure à 30 kb. Ceci est particulièrement intéressant pour certaines pathologies dont le traitement nécessite la co-expression de plusieurs gènes, ou l'expression de très grands gènes. Ainsi par

exemple, dans le cas de la dystrophie musculaire, il n'était pas possible jusqu'à présent de transférer l'ADNc correspondant au gène natif responsable de cette pathologie (gène de la dystrophine) en raison de sa grande taille (14 kb).

Les vecteurs de l'invention sont également très avantageux puisqu'ils possèdent très peu de régions virales fonctionnelles et que, de ce fait, les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique tels que l'immunogénicité, la pathogénicité, la transmission, la réplication, la recombinaison, etc sont fortement réduits voire supprimés.

La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux particulièrement adaptés au transfert et à l'expression *in vivo* de séquences d'ADN désirées.

Un premier objet de la présente invention concerne donc un adénovirus recombinant défectif comprenant :

15 - les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue,

et dans lequel :

- le gène E1 est non fonctionnel et
- au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

20 Au sens de la présente invention, le terme "adénovirus défectif" désigne un adénovirus incapable de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs selon la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la 25 séquence d'ADN hétérologue.

30 Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réplication des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2).

Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus, entre l'ITR gauche (5') et le gène E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidique de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence d'encapsidation correspond à la région comprenant les nucléotides 194 à 358 du génome.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus présentent une organisation génétique comparable, et les enseignements décrits dans la présente demande peuvent être aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Les adénovirus de l'invention peuvent être d'origine humaine, animale, ou mixte (humaine et animale).

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés (Cf demande FR 93 05954). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation *in vivo*, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est

donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., 5 *Virology* 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les 10 souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340); 15 l'adénovirus porcin 5359), ou les adénovirus simiens tels que notamment les adénovirus référencés à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine 20 canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., *J. Gen. Virol.* 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés 25 et séquencés (voir notamment Spibey et al., *Virus Res.* 14 (1989) 241; Linné, *Virus Res.* 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de la présente invention comportent une séquence d'ADN hétérologue. La séquence d'ADN hétérologue désigne toute 30 séquence d'ADN introduite dans le virus recombinant, dont le transfert et/ou l'expression dans la cellule cible est recherchée.

En particulier, la séquence d'ADN hétérologue peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques et/ou un ou plusieurs gènes codant pour des peptides antigéniques.

Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

Il peut s'agir en particulier de gènes codant pour des produits protéiques ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, un acide aminé, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrives, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

Comme indiqué plus haut, la séquence d'ADN hétérologue peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation de vaccins permettant d'immuniser

l'homme, notamment contre des microorganismes ou des virus. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

5 Généralement, la séquence d'ADN hétérologue comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule infectée. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de 10 séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, 15 on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

20 Par ailleurs, la séquence d'ADN hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal 25 artificielle.

30 Comme indiqué ci-avant, les vecteurs de l'invention possèdent au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression, substitution, délétion, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes.

Parmi les agents mutagènes, on peut citer par exemple les agents physiques tels que les rayonnements énergétiques (rayons X, g, ultra violet, etc..), ou les agents

chimiques capables de réagir avec différents groupements fonctionnels des bases de l'ADN, et par exemple les agents alkylants [éthylméthane sulfonate (EMS), N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-nitroquinoléine-1-oxyde (NQO)], les agents bialkylants, les agents intercalants, etc.

5 Par délétion on entend au sens de l'invention toute suppression du gène considéré. Il peut s'agir notamment de tout ou partie de la région codante dudit gène, et/ou de tout ou partie de la région promotrice de la transcription dudit gène. La suppression peut être effectuée par digestion au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques classiques de biologie moléculaire, ainsi 10 qu'ilustré dans les exemples.

Les modifications génétiques peuvent également être obtenues par disruption génique, par exemple selon le protocole initialement décrit par Rothstein [Meth. Enzymol. 101 (1983) 202]. Dans ce cas, tout ou partie de la séquence codante est 15 préférentiellement perturbée pour permettre le remplacement, par recombinaison homologue, de la séquence génomique par une séquence non fonctionnelle ou mutante.

La ou lesdites modifications génétiques peuvent être localisées dans la partie codante du gène concerné, ou en dehors de la région codante, et par exemple dans les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits 20 gènes. Le caractère non fonctionnel desdits gènes peut donc se manifester par la production d'une protéine inactive en raison de modifications structurales ou conformationnelles, par l'absence de production, par la production d'une protéine ayant une activité altérée, ou encore par la production de la protéine naturelle à un niveau atténué ou selon un mode de régulation désiré.

25 Par ailleurs, certaines altérations telles que des mutations ponctuelles sont par nature capables d'être corrigées ou atténuées par des mécanismes cellulaires. De telles altérations génétiques ont alors un intérêt limité au niveau industriel. Il est donc particulièrement préféré que le caractère non fonctionnel soit parfaitement stable ségrégationnellement et/ou non-réversible. .

30 De préférence, le gène est non fonctionnel en raison d'une délétion partielle ou totale.

Préférentiellement, les adénovirus recombinants défectifs de l'invention sont dépourvus de gènes tardifs d'adénovirus.

35 Un mode particulièrement avantageux de l'invention consiste en un adénovirus recombinant défectif comprenant :

- les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue, et
- une région portant le gène ou une partie du gène E2.

5 Un autre mode particulièrement avantageux de l'invention consiste en un adénovirus recombinant défectif comprenant :

- les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue, et
- 10 - une région portant le gène ou une partie du gène E4.

Toujours dans un mode particulièrement avantageux, les vecteurs de l'invention possèdent en outre un gène E3 fonctionnel sous contrôle d'un promoteur hétérologue. Plus préférentiellement, les vecteurs possèdent une partie du gène E3 permettant l'expression de la protéine gp19K.

15 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfacter l'ADN du virus recombinant défectif préparé *in vitro* (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la 20 complémentation du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui permet d'éviter les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire. La préparation de telles lignées cellulaires est décrite dans les exemples.

Une seconde approche consiste à co-transfacter dans une lignée cellulaire 25 appropriée l'ADN du virus recombinant défectif préparé *in vitro* (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) et l'ADN d'un virus helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de complémenter toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces 30 fonctions est en effet complémentée par le virus helper. Ce virus helper doit lui-même être défectif et la lignée cellulaire porte en trans les fonctions nécessaires à sa complémentation. La préparation d'adénovirus recombinants défectifs de l'invention selon cette méthode est également illustrée dans les exemples.

Parmi les lignées cellulaires utilisables dans le cadre de cette seconde approche, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire humain 293, les cellules KB, les cellules Hela, MDCK, GHK, etc (Cf exemples).

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés sont récupérés, purifiés et 5 amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention concerne donc aussi les lignées cellulaires infectables par les adénovirus, comprenant, intégrées dans leur génome, les fonctions nécessaires à la complémentation d'un adénovirus recombinant défectif tel que décrit précédemment. En particulier, elle concerne les lignées cellulaires comportant, 10 intégrées dans leur génome, les régions E1 et E2 (notamment la région codant pour la protéine 72K), et/ou E4 et/ou le gène du récepteur aux glucocorticoïdes. Préférentiellement, ces lignées sont obtenues à partie de la lignée 293 ou gm DBP6.

La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits 15 précédemment. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en 20 particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

25 Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de 30 préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de

cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

5 Selon la séquence d'ADN hétérologue insérée, les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose cystique, etc), les maladies neurogégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéinémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

10 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

15 Figure 2 : Carte de restriction de l'adénovirus CAV2 souche Manhattan (d'après Spibey et al précité).

Figure 3 : Construction de virus défectifs de l'invention par ligature.

Figure 4 : Construction d'un virus recombinant portant le gène E4.

Figure 5 : Construction d'un virus recombinant portant le gène E2.

20 Figure 6 : Construction et représentation du plasmide pPY32.

Figure 7 : Représentation du plasmide pPY55.

Figure 8 : Représentation du plasmide p2.

Figure 9 : Représentation du plasmide intermédiaire utilisé pour la construction du plasmide pITRL5-E4.

25 Figure 10 : Représentation du plasmide pITRL5-E4.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de

l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

5 Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

10 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

15 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

20 La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

25 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Lignées cellulaires utilisées

30 Dans les exemples qui suivent, les lignées cellulaires suivantes ont ou peuvent être utilisées :

- Lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %).

- Lignée de cellules humaines KB : Issue d'un carcinome épidermique humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant sa culture.
- 5 - Lignée de cellules humaines Hela : Issue d'un carcinome de l'épithelium humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture.
- Lignée de cellules canines MDCK : Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., *Science* 44 (1988) 9.
- Lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., *Virology* 190 (1992) 624).
- 10 Cette lignée est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

EXEMPLES

Exemple 1

Cet exemple démontre la faisabilité d'un adénovirus recombinant dépourvu de l'essentiel des gènes viraux. Pour cela, une série de mutants de délétion dans l'adénovirus a été construite par ligation *in vitro*, et chacun de ces mutants a été co-transfектé avec un virus helper dans les cellules KB. Ces cellules ne permettant pas la propagation des virus défectifs pour E1, la transcomplémentation porte sur la région E1.

20 Les différents mutants de délétion ont été préparés à partir de l'adénovirus Ad5 par digestion puis ligation *in vitro*. Pour cela, l'ADN viral d'Ad5 est isolé selon la technique décrite par Lipp et al. (*J. Virol.* 63 (1989) 5133), soumis à digestion en présence de différentes enzymes de restriction (Cf figure 3), puis le produit de la digestion est ligaturé en présence de T4 DNA ligase. La taille des différents mutants de délétion est ensuite contrôlée sur gel SDS agarose 0,8%. Ces mutants sont ensuite cartographiés (Cf figure 3). Ces différents mutants comportent les régions suivantes :
mt1 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-20642(SauI) et (SauI)33797-35935
mt2 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-19549(NdeI) et (NdeI)31089-35935
mt3 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-10754(AatII) et (AatII)25915-35935
25 mt4 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-11311(MluI) et (MluI)24392-35935
mt5 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-9462(Sall) et (XhoI)29791-35935
mt6 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-5788(XhoI) et (XhoI)29791-35935
30 mt7 : Ligation entre les fragments d'Ad5 0-3665(SphI) et (SphI)31224-35935

Chacun des mutants préparés ci-dessus a été co-transfecté avec l'ADN viral de Ad.RSV β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J.Clin.Invest. 90 (1992) 626) dans les cellules KB, en présence de phosphate de calcium. Les cellules ont été récoltées 8 jours après la transfection, et les surnageants de culture ont été récoltés puis amplifiés sur cellules KB jusqu'à l'obtention de stocks de 50 boîtes pour chaque transfection. A partir de chaque échantillon, l'ADN épisomique a été isolé et séparé sur gradient de chlorure de césum. Deux bandes distinctes de virus ont été observées dans chaque cas, prélevées et analysées. La plus lourde correspond à l'ADN viral de Ad.RSV β Gal, et la plus légère à l'ADN du virus recombinant généré par ligation (figure 3). Le titre obtenu pour cette dernière est d'environ 10⁸ pfu/ml.

Une seconde série de mutants de délétion dans l'adénovirus a été construite par ligation *in vitro* selon la même méthodologie. Ces différents mutants comportent les régions suivantes :

15 mt8 : Ligation entre les fragments 0-4623(ApaI) d'Ad RSV β Gal et (ApaI)31909-35935 d'Ad5.

mt9 : Ligation entre les fragments 0-10178(BglII) d'Ad RSV β Gal et (BamHI)21562-35935 d'Ad5.

20 Ces mutants, portant le gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR du virus RSV, sont ensuite co-transférés dans les cellules 293 en présence de l'ADN viral de H2dl808 (Weinberg et al., J. Virol. 57 (1986) 833), qui est déleté de la région E4. Selon cette seconde technique, la transcomplémentation porte sur E4 et non plus sur E1. Cette technique permet ainsi de générer, comme décrit ci-dessus, des virus recombinants ne possédant comme gène viral que la région E4.

Exemple 2

25 Cet exemple décrit la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention par co-transfection, avec un virus helper, de l'ADN du virus recombinant incorporé à un plasmide.

30 Pour cela, un plasmide portant les ITR jointives de l'Ad5, la séquence d'encapsulation, le gène E4 sous contrôle de son propre promoteur et, comme gène hétérologue, le gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR du virus RSV a été construit (figure 4). Ce plasmide, désigné pE4Gal a été obtenu par clonage et ligature des fragments suivants (voir figure 4) :

- fragment HindIII-SacII issu du plasmide pFG144 (Graham et al, EMBO J. 8 (1989) 2077). Ce fragment porte les séquences ITR de l'Ad5 en tête à queue et la séquence d'encapsidation : fragment HindIII (34920)-SacII (352).
- 5 - fragment de l'Ad5 compris entre les sites SacII (localisé au niveau de la paire de bases 3827) et PstI (localisé au niveau de la paire de bases 4245);
- fragment de pSP 72 (Promega) compris entre les sites PstI (pb 32) et SalI (pb 34);
- 10 - fragment XhoI-XbaI du plasmide pAdLTR GalIX décrit dans Stratford-Perricaudet et al (JCI 90 (1992) 626). Ce fragment porte le gène LacZ sous contrôle du LTR du virus RSV.
 - fragment XbaI (pb 40) - NdeI (pb 2379) du plasmide pSP 72;
 - fragment NdeI (pb 31089) - HindIII (pb 34930) de l'Ad5. Ce fragment localisé dans l'extrémité droite du génome de l'Ad5 contient la région E4 sous contrôle de son propre promoteur. Il a été cloné au niveau des sites NdeI (2379) du plasmide pSP 72 et HindIII du premier fragment.
- 15

Ce plasmide a été obtenu par clonage des différents fragments dans les régions indiquées du plasmide pSP 72. Il est entendu que des fragments équivalents peuvent être obtenus par l'homme du métier à partir d'autres sources.

Le plasmide pE4Gal est ensuite co-transfектé avec l'ADN du virus H2dl808 20 dans les cellules 293 en présence de phosphate de calcium. Le virus recombinant est ensuite préparé comme décrit dans l'exemple 1. Ce virus porte, comme seul gène viral, le gène E4 de l'adénovirus Ad5 (figure 4). Son génome a une taille de 12 kb environ, ce qui permet l'insertion d'ADN hétérologue de très grande taille (jusqu'à 20 kb). Ainsi, l'homme du métier peut aisément remplacer le gène LacZ par tout autre gène 25 thérapeutique tels que ceux mentionnés plus haut. Par ailleurs, ce virus comporte certaines séquences issues du plasmide pSP 72, qui peuvent être éliminées par les techniques classiques de biologie moléculaires si nécessaire.

Exemple 3

Cet exemple décrit la préparation d'un autre adénovirus recombinant défectif 30 selon l'invention par co-transfection, avec un virus helper, de l'ADN du virus recombinant incorporé à un plasmide.

Pour cela, un plasmide portant les ITR jointives de l'Ad5, la séquence d'encapsidation, le gène E2 de l'Ad2 sous contrôle de son propre promoteur et, comme

gène hétérologue, le gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR du virus RSV a été construit (figure 5). Ce plasmide, désigné pE2Gal a été obtenu par clonage et ligature des fragments suivants (voir figure 5) :

- fragment HindIII-SacII issu du plasmide pFG144 (Graham et al, EMBO J. 8 (1989) 2077). Ce fragment porte les séquences ITR de l'Ad5 en tête à queue et la séquence d'encapsidation : fragment HindIII (34920)-SacII (352). Il a été cloné, avec le fragment suivant, au niveau des sites HindIII (16) - PstI (32) du plasmide pSP 72.
- fragment de l'Ad5 compris entre les sites SacII (localisé au niveau de la paire de bases 3827) et PstI (localisé au niveau de la paire de bases 4245). Ce fragment a été cloné au niveau du site SacII du fragment précédent et du site PstI (32) du plasmide pSP 72.
- fragment de pSP 72 (Promega) compris entre les sites PstI (pb 32) et SalI (pb 34);
- fragment XhoI-XbaI du plasmide pAdLTR GalIX décrit dans Stratford-Perricaudet et al (JCI 90 (1992) 626). Ce fragment porte le gène LacZ sous contrôle du LTR du virus RSV. Il a été cloné au niveau des sites SalI (34) et XbaI du plasmide pSP 72.
- fragment de pSP 72 (Promega) compris entre les sites XbaI (pb 34) et BamHI (pb 46);
- fragment BamHI (pb 21606) - SmaI (pb 27339) de l'Ad2. Ce fragment du génome de l'Ad2 contient la région E2 sous contrôle de son propre promoteur. Il a été cloné au niveau des sites BamHI (46) et EcoRV du plasmide pSP 72.
- fragment EcoRV (pb 81) - HindIII (pb 16) du plasmide pSP 72.

Ce plasmide a été obtenu par clonage des différents fragments dans les régions indiquées du plasmide pSP 72. Il est entendu que des fragments équivalents peuvent être obtenus par l'homme du métier à partir d'autres sources.

Le pE2Gal plasmide est ensuite co-transfектé avec l'ADN du virus H2dl802 dépourvu de la région E2 (Rice et al. J. Virol. 56 (1985) 767) dans les cellules 293, en présence de phosphate de calcium. Le virus recombinant est ensuite préparé comme décrit dans l'exemple 1. Ce virus porte, comme seul gène viral, le gène E2 de l'adénovirus Ad2 (figure 5). Son génome a une taille de 12 kb environ, ce qui permet l'insertion d'ADN hétérologue de très grande taille (jusqu'à 20 kb). Ainsi, l'homme du métier peut aisément remplacer le gène LacZ par tout autre gène thérapeutique tels que ceux mentionnés plus haut. Par ailleurs, ce virus comporte certaines séquences

issues du plasmide intermédiaire, qui peuvent être éliminées par les techniques classiques de biologie moléculaires si nécessaire.

Exemple 4

Cet exemple décrit la construction de lignées cellulaires complémentantes pour les régions E1, E2 et/ou E4 des adénovirus. Ces lignées permettent la construction d'adénovirus recombinants selon l'invention déléteés pour ces régions, sans avoir recours à un virus helper. Ces virus sont obtenus par recombinaison *in vivo*, et peuvent comporter des séquences hétérologues importantes.

Dans les lignées cellulaires décrites, les régions E2 et E4, potentiellement cytotoxiques, sont placées sous le contrôle d'un promoteur inductible : le LTR de MMTV (Pharmacia), qui est induit par la dexaméthasone, soit natif, soit la forme minimale décrite dans PNAS 90 (1993) 5603; ou le système repressible par la tétracycline décrit par Gossen et Bujard (PNAS 89 (1992) 5547). Il est entendu que d'autres promoteurs peuvent être utilisés, et notamment des variants du LTR de MMTV portant par exemple des régions hétérologues de régulation (région "enhancer" notamment). Les lignées de l'invention ont été construites par transfection des cellules correspondantes, en présence de phosphate de calcium, par un fragment d'ADN portant les gènes indiqués (régions d'adénovirus et/ou gène du récepteur aux glucocorticoïdes) sous le contrôle d'un promoteur de la transcription et d'un 10 terminateur (site de polyadénylation). Le terminateur peut être soit le terminateur naturel du gène transfecté, soit un terminateur différent comme par exemple le terminateur du messager précoce du virus SV40. Avantageusement, le fragment d'ADN porte également un gène permettant la sélection des cellules transformées, et par exemple le gène de la résistance à la génétidine. Le gène de résistance peut également être porté par un fragment d'ADN différent, co-transfектé avec le premier.

Après transfection, les cellules transformées sont sélectionnées et leur ADN est analysé pour vérifier l'intégration du fragment d'ADN dans le génome.

Cette technique permet d'obtenir les lignées cellulaires suivantes :

1. Cellules 293 possédant le gène de la 72K de la région E2 d'Ad5 sous contrôle du LTR de MMTV;
2. Cellules 293 possédant le gène de la 72K de la région E2 d'Ad5 sous contrôle du LTR de MMTV et le gène du récepteur aux glucocorticoïdes;
3. Cellules 293 possédant le gène de la 72K de la région E2 d'Ad5 sous contrôle du LTR de MMTV et la région E4 sous contrôle du LTR de MMTV;

4. Cellules 293 possèdant le gène de la 72K de la région E2 d'Ad5 sous contrôle du LTR de MMTV, la région E4 sous contrôle du LTR de MMTV, et le gène du récepteur aux glucocorticoïdes;
5. Cellules 293 possèdant la région E4 sous contrôle du LTR de MMTV;
6. Cellules 293 possèdant la région E4 sous contrôle du LTR de MMTV et le gène du récepteur aux glucocorticoïdes;
7. Cellules gm DBP6 possédant les régions E1A et E1B sous contrôle de leur propre promoteur;
8. Cellules gm DBP6 possédant les régions E1A et E1B sous contrôle de leur propre promoteur et la région E4 sous contrôle du LTR de MMTV.

Exemple 5

Cet exemple décrit la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention dont le génome est déléte des gènes E1, E3 et E4. Selon un mode avantageux de réalisation, illustré dans cet exemple et dans l'exemple 3 notamment, le génome des adénovirus recombinants de l'invention est modifié de sorte que les gènes E1 et E4 au moins soient non-fonctionnels. De tels adénovirus possèdent tout d'abord une capacité d'incorporation de gènes hétérologues importante. Par ailleurs, ces vecteurs présentent une sécurité élevée en raison de la déletion de la région E4, qui est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Ces vecteurs possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. Enfin, de manière particulièrement avantageuse, ces vecteurs peuvent être produits à des titres comparables aux adénovirus sauvages.

Ces adénovirus ont été préparés à partir du plasmide pPY55, portant la partie droite modifiée du génome de l'adénovirus Ad5, soit par co-transfection avec un plasmide helper (voir également exemples 1, 2 et 3), soit au moyen d'une lignée complémentante (exemple 4).

5.1 Construction du plasmide pPY55

a) Construction du plasmide pPY32

Le fragment AvrII-BcII du plasmide pFG144 [F.L. Graham et al. EMBO J. 8 (1989) 2077-2085], correspondant à l'extrémité droite du génome de l'adénovirus Ad5, a d'abord été cloné entre les sites XbaI et BamHI du vecteur pIC19H, préparé à partir d'un contexte *dam*- . Ceci génère le plasmide pPY23. Une caractéristique intéressante du plasmide pPY23 est que le site SalI provenant du multisite de clonage du vecteur pIC19H reste unique et qu'il est localisé à coté de l'extrémité droite du génome de l'adénovirus Ad5. Le fragment HaeIII-SalI du plasmide pPY23 qui contient l'extrémité droite du génome de l'adénovirus Ad5, à partir du site HaeIII localisé en position 35614, a ensuite été cloné entre les sites EcoRV et XhoI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY29. Une caractéristique intéressante de ce plasmide est que les sites XbaI et Clal provenant du multisite de clonage du vecteur pIC20H sont localisés à coté de la jonction EcoRV/HaeIII résultant du clonage. De plus cette jonction modifie le contexte nucléotidique immédiatement adjacent au site Clal qui est maintenant devenu méthylable dans un contexte *dam*+ . Le fragment XbaI(30470)-MaeII(32811) du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites XbaI et Clal du plasmide pPY29 préparé à partir d'un contexte *dam*- , ce qui génère le plasmide pPY30. Le fragment SstI du plasmide pPY30, qui correspond à la séquence du génome de l'adénovirus Ad5 du site SstI en position 30556 jusqu'à l'extrémité droite a enfin été cloné entre les sites SstI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY31, dont une carte de restriction de l'insert localisé entre les sites HindIII est donnée à la Figure 6.

Le plasmide pPY32 a été obtenu après digestion partielle du plasmide pPY31 par BglII, suivie d'une digestion totale par BamHI, puis religature. Le plasmide pPY32 correspond donc à la délétion du génome de l'adénovirus Ad5 située entre le site BamHI du plasmide pPY31 et le site BglII localisé en position 30818. Une carte de restriction du fragment HindIII du plasmide pPY32 est donnée à la Figure 6. Une caractéristique du plasmide pPY32 est qu'il possède des sites SalI et XbaI uniques.

b) Construction du plasmide pPY47

Le fragment BamHI(21562)-XbaI(28592) du génome de l'adénovirus Ad5 a tout d'abord été cloné entre les sites BamHI et XbaI du vecteur pIC19H préparé à partir d'un contexte *dam*- , ce qui génère le plasmide pPY17. Ce plasmide contient donc un fragment HindIII (26328)-BglII(28133) du génome de l'adénovirus Ad5, qui peut être cloné entre les sites HindIII et BglII du vecteur pIC20R, pour générer le

plasmide pPY34. Une caractéristique de ce plasmide est que le site BamHI provenant du multisite de clonage est localisé à proximité immédiate du site HindIII(26328) du génome de l'adénovirus Ad5.

5 Le fragment BamHI (21562)-HindIII(26328) du génome de l'adénovirus Ad5 provenant du plasmide pPY17 a ensuite été cloné entre les sites BamHI et HindIII du plasmide pPY34, ce qui génère le plasmide pPY39. Le fragment BamHI-XbaI du plasmide pPY39 préparé à partir d'un contexte dam-, contenant la partie du génome de l'adénovirus Ad5 comprise entre les sites BamHI(21562) et BglII(28133), a ensuite été 10 cloné entre les sites BamHI et XbaI du vecteur pIC19H préparé à partir d'un contexte dam-. Ceci génère le plasmide pPY47 dont une caractéristique intéressante est que le site SalI provenant du multisite de clonage est localisé à proximité du site HindIII (figure 7).

15 c) Construction du plasmide pPY55

Le fragment SalI-XbaI du plasmide pPY47 préparé à partir d'un contexte dam-, et qui contient la partie du génome de l'adénovirus Ad5 allant du site BamHI(21562) jusqu'au site BglII(28133), a été cloné entre les sites SalI et XbaI du plasmide pPY32, ce qui génère le plasmide pPY55. Ce plasmide est directement 20 utilisable pour l'obtention d'adénovirus recombinants au moins déletés pour la région E3 (délétion entre les sites BglII localisés aux positions 28133 et 30818 du génome de l'adénovirus Ad5) et pour la région E4 dans son intégralité (délétion entre les sites MaeII(32811) et HaeIII(35614) du génome de l'adénovirus Ad5 (figure 7).

25 5.2 Préparation des adenovirus comprenant au moins une délétion dans la région E4, et, de préférence, au moins dans les régions E1 et E4.

a) Préparation par co-transfection avec un virus helper E4 dans les cellules

293

30 Le principe repose sur la transcomplémentation entre un "mini-virus" (virus helper) exprimant la région E4 et un virus recombinant déleté au moins pour E3 et E4. Ces virus sont obtenus soit par ligature *in vitro*, soit après recombinaison *in vivo*, selon les stratégies suivantes :

(i) L'ADN du virus Ad-dl324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le plasmide pPY55, tous deux digérés par BamHI, sont d'abord ligaturés *in vitro*, puis cotransférés avec le plasmide pEAGal (décris dans l'exemple 2) dans les cellules 293.

5 (ii) L'ADN du virus Ad-dl324 digéré par EcoRI et le plasmide pPY55 digéré par BamHI sont contranfectés, avec le plasmide pE4Gal, dans les cellules 293.

(iii) L'ADN de l'adénovirus Ad5 et le plasmide pPY55, tous deux digérés par BamHI, sont ligaturés puis cotransférés avec le plasmide pE4Gal dans les cellules 293.

10 (iv) L'ADN de l'adénovirus Ad5 digéré par EcoRI et le plasmide pPY55 digéré par BamHI sont cotransférés avec le pEAGal dans les cellules 293.

15 Les stratégies (i) et (ii) permettent de générer un adénovirus recombinant déleté pour les régions E1, E3 et E4; les stratégies (iii) et (iv) permettent de générer un adénovirus recombinant déleté pour les régions E3 et E4. Bien entendu, l'ADN d'un virus recombinant déleté pour la région E1 mais exprimant un transgène quelconque peut être utilisé à la place de l'ADN du virus Ad-dl324 selon les stratégies (i) ou (ii), dans le but de générer un virus recombinant déleté pour les régions E1, E3 et E4 et exprimant ledit transgène.

20 b) Préparation au moyen de lignées cellulaires transcomplémentant les fonctions E1 et E4

25 Le principe repose ici sur le fait qu'une lignée cellulaire dérivée d'une lignée exprimant la région E1, par exemple la lignée 293, et exprimant également au moins les phases ouvertes ORF6 et ORF6/7 de la région E4 de l'adénovirus Ad5 sous contrôle d'un promoteur, par exemple inductible, est capable de transcomplémer à la fois pour les régions E1 et E4 de l'adénovirus Ad5. De telles lignées ont été décrites dans l'exemple 4.

30 Un virus recombinant déleté pour les régions E1, E3 et E4 peut donc être obtenu par ligation *in vitro* ou par recombinaison *in vivo* selon les protocoles décrits ci-dessus. Quelque soit le protocole utilisé pour générer les virus déletés au moins pour la région E4, un effet cytopathique (indiquant la production de virus recombinants) a été observé après transfection dans les cellules utilisées. Les cellules ont ensuite été récoltées, disruptées par trois cycles de congélation-décongélation dans leur surnageant, puis centrifugées à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a ensuite été amplifié sur culture cellulaire fraîche (cellules 293 pour les protocoles a) et cellules 293 exprimant la région E4

pour le protocole b)). Les virus ont alors été purifiés à partir de plages et leur ADN est analysé selon la méthode de Hirt (précité). Des stocks de virus sont ensuite préparés sur gradient de chlorure de césium.

Exemple 6

5

Cet exemple décrit la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention dont le génome est déléte des gènes E1, E3, L5 et E4. Ces vecteurs sont particulièrement avantageux puisque la région L5 code pour la fibre, qui est une protéine extrêmement toxique pour la cellule.

10

Ces adénovirus ont été préparés à partir du plasmide p2, portant la partie droite modifiée du génome de l'adénovirus Ad5, par co-transfection avec différents plasmides helper. Ils peuvent également être préparés au moyen d'une lignée complémentante.

15

6.1 Construction du plasmide p2

16

Ce plasmide contient toute la région droite du génome de l'adénovirus Ad5, à partir du site BamHII (21562), de laquelle a été déléte le fragment compris entre les sites XbaI (28592) et AvrII (35463), portant les gènes E3, L5 et E4. Le plasmide p2 a été obtenu par clonage et ligature des fragments suivants dans le plasmide pIC19R linéarisé par BamHII et déphosphorylé (voir figure 8) :

20

- fragment du génome de l'adénovirus Ad5 compris entre les sites BamHII (21562) et XbaI (28592), et
- extrémité droite du génome de l'adénovirus Ad5 (contenant l'ITR droite), à partir du site AvrII (35463), jusqu'au site BclI (compatible BamHII).

25

6.2. Construction d'un plasmide helper (pITRL5-E4) portant le gène L5

26

Le plasmide helper pITRL5-E4 apporte en trans les gènes E4 et L5. Il correspond au plasmide pE4Gal décrit dans l'exemple 2, contenant en plus la région L5 codant pour la fibre sous contrôle du promoteur MLP de l'adénovirus Ad2. Le plasmide pITRL5-E4 a été construit de la manière suivante (figures 9 et 10) :

Un oligonucléotide de 58 pb contenant, dans le sens 5'-3', un site HindIII, l'ATG de la fibre et la séquence codante de la fibre jusqu'au site NdeI en position 31089 du génome de l'adénovirus Ad5 a été synthétisé. La séquence de cet oligonucléotide est donnée ci-dessous, dans l'orientation 5'-3' :

35

AAGCTTATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATAACCTCAACCCGTGTATCCATATG

Les sites HindIII, en 5', et NdeI, en 3', sont soulignés en simple, l'ATG de la fibre est souligné en double.

5 Un fragment SspI-HindIII contenant la séquence du promoteur MLP suivie du tripartite leader de l'adénovirus Ad2 a été isolé à partir du plasmide pMLP10 (Ballay et al., (1987) UCLA Symposia on molecular and cellular biology, New series, Vol 70, Robinson et al (Eds) New-York, 481). Ce fragment a été inséré avec l'oligonucléotide de 58 pb décrit ci-dessus entre les sites NdeI et EcoRV du plasmide 10 pIC19R, pour donner un plasmide intermédiaire (voir figure 9). Le fragment SacII (rendu blunt)-NdeI du plasmide pE4Gal (exemple 2) a ensuite été introduit dans le plasmide intermédiaire entre les sites SspI et NddeI pour générer le plasmide pITRL5-E4 (figure 10).

15 6.3 Préparation des adenovirus recombinants défectifs comprenant une délétion dans les régions E1, E3, L5 et E4.

a) Préparation par co-transfection avec un virus helper dans les cellules 293
Le principe repose sur la transcomplémentation entre un "mini-virus" (virus 20 helper) exprimant la région L5 ou les régions E4 et L5 et un virus recombinant déléte au moins pour E3, E4 et L5.

Ces virus ont été obtenus soit par ligature in vitro, soit après recombinaison in vivo, selon les stratégies suivantes :

(i) L'ADN du virus Ad-dl324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le 25 plasmide p2, tous deux digérés par BamHI, ont tout d'abord été ligaturés in vitro, puis cotransférés avec le plasmide helper pITRL5-E4 (exemple 6.2.) dans les cellules 293.

(ii) L'ADN du virus Ad-dl324 digéré par EcoRI et le plasmide p2 digéré par BamHI sont contranfectés, avec le plasmide pITRL5-E4, dans les cellules 293.

(iii) L'ADN de l'adénovirus Ad5 et le plasmide p2, tous deux digérés par 30 BamHI, sont ligaturés puis cotransférés avec le plasmide pITRL5-E4 dans les cellules 293.

(iv) L'ADN de l'adénovirus Ad5 digéré par EcoRI et le plasmide p2 digéré par BamHI sont cotransférés avec le pITRL5-E4 dans les cellules 293.

Les stratégies (i) et (ii) permettent de générer un adénovirus recombinant déléte pour les régions E1, E3, L5 et E4; les stratégies (iii) et (iv) permettent de générer un adénovirus recombinant déléte pour les régions E3, L5 et E4. Bien entendu, l'ADN d'un virus recombinant déléte pour la région E1 mais exprimant un transgène quelconque peut être utilisé à la place de l'ADN du virus Ad-dl324 selon les stratégies (i) ou (ii), dans le but de générer un virus recombinant déléte pour les régions E1, E3, L5 et E4 et exprimant ledit transgène.

Les protocoles décrits ci-dessus peuvent également être mis en oeuvre avec un virus helper ne portant que la région L5, en utilisant une lignée cellulaire capable d'exprimer les régions E1 et E4 de l'adénovirus, telle que décrite dans l'exemple 4.

Par ailleurs, il est également possible d'utiliser une lignée complémentante capable d'exprimer les régions E1, E4 et L5, de façon à s'affranchir totalement de l'emploi d'un virus helper.

Après la transfection, les virus produits sont récupérés, amplifiés et purifiés dans les conditions décrites dans l'exemple 5.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant :

- les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue,

5

et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est d'origine humaine, animale, ou mixte.

10 3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence parmi les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

4. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.

15 5. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que les gènes E1 et E4 au moins sont non-fonctionnels.

6. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est dépourvu de gènes tardifs.

20 7. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend :
- les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue, et
- une région portant le gène ou une partie du gène E2.

25 8. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend :
- les séquences ITR,
- une séquence permettant l'encapsidation,
- une séquence d'ADN hétérologue, et
- une région portant le gène ou une partie du gène E4.

9. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que son génome est délétré des gènes E1, E3 et E4.

10. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que son génome est délétré des gènes E1, E3, L5 et E4.

5 11. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend en outre un gène E3 fonctionnel sous contrôle d'un promoteur hétérologue.

10 12. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comporte un ou plusieurs gènes thérapeutiques et/ou un ou plusieurs gènes codant pour des peptides antigéniques.

15 13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le gène thérapeutique est choisi parmi les gènes codant pour des enzymes, des dérivés sanguins, des hormones, des lymphokines (interleukines, interférons, TNF, etc), des facteurs de croissance, des neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, des facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc), des apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc), la dystrophine ou une minidystrophine, des gènes suppresseurs de tumeurs ou des gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (Facteurs VII, VIII, IX, etc).

20 14. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le gène thérapeutique est un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires.

15. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le gène code pour un peptide antigénique capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire contre des microorganismes ou des virus.

25 16. Adénovirus selon la revendication 15 caractérisé en ce que le gène code pour un peptide antigénique spécifique du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B, du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifique de tumeurs.

17. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend également des séquences permettant

l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule infectée.

18. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend, en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible.

5 19. Lignée cellulaire infectable par un adénovirus comprenant, intégrées dans son génome, les fonctions nécessaires à la complémentation d'un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 18.

10 20. Lignée cellulaire selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle comporte dans son génome au moins les gènes E1 et E2 d'un adénovirus.

21. Lignée cellulaire selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre le gène E4 d'un adénovirus.

15 22. Lignée cellulaire selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle comporte dans son génome au moins les gènes E1 et E4 d'un adénovirus.

23. Lignée cellulaire selon les revendications 19 à 22 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre le gène du récepteur aux glucocorticoïdes.

24. Lignée cellulaire selon les revendications 19 à 23 caractérisée en ce que les gènes E2 et E4 sont placés sous le contrôle d'un promoteur inductible.

20 25. Lignée cellulaire selon la revendication 24 caractérisée en ce que le promoteur inductible est le promoteur LTR de MMTV.

26. Lignée cellulaire selon les revendications 19 à 25 caractérisée en ce que le gène E2 code pour la protéine 72K.

25 27. Lignée cellulaire selon les revendications 19 à 26 caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir de la lignée 293.

28. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 18.

29. Composition pharmaceutique selon la revendication 28 comprenant un adénovirus recombinant selon l'une des revendications 5 à 10.

30. Composition pharmaceutique selon les revendications 28 ou 29 comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation 5 injectable.

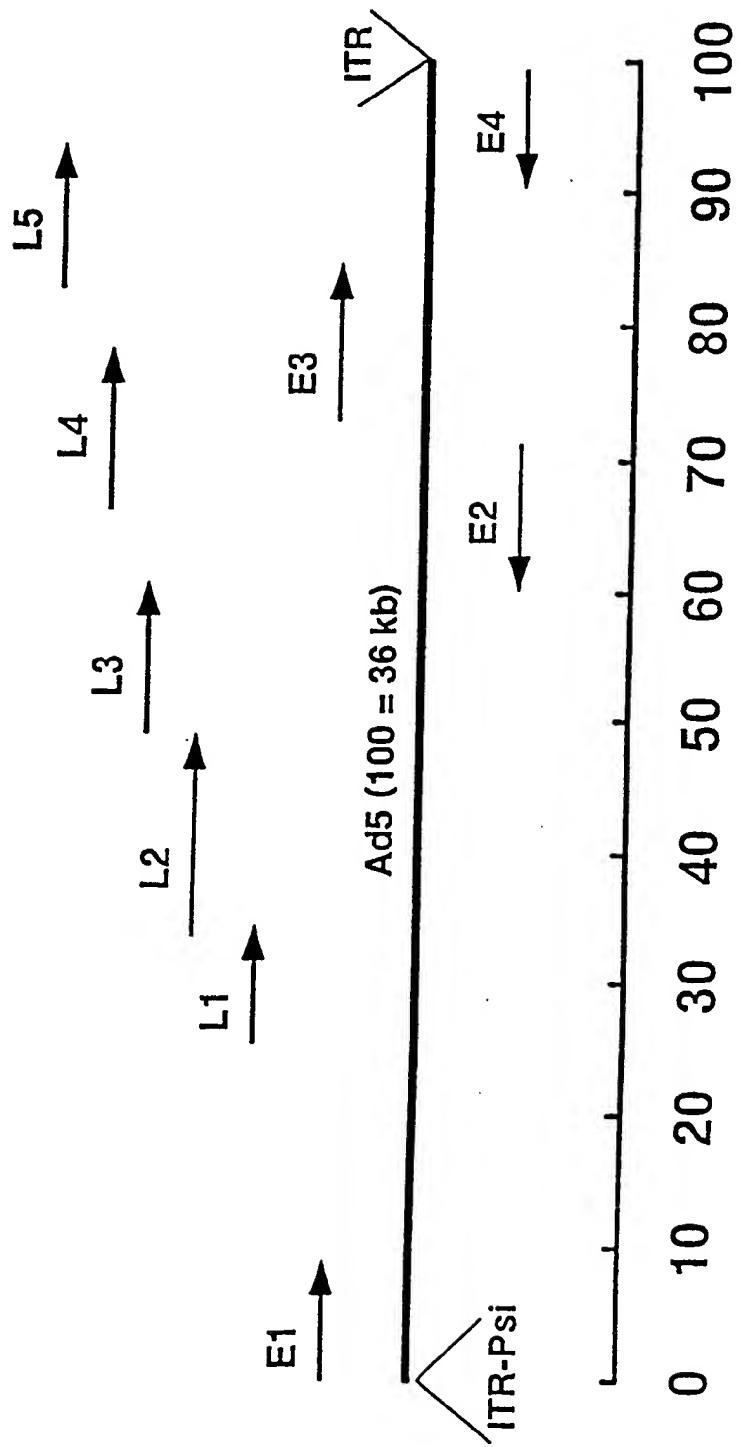


Figure 1

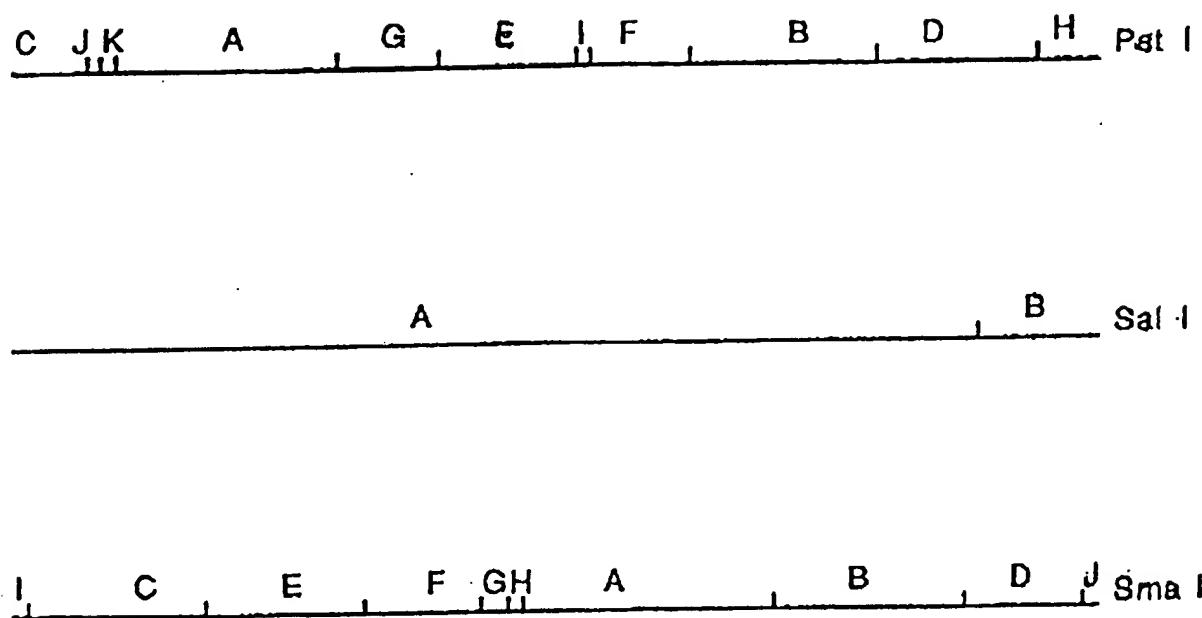


Figure 2

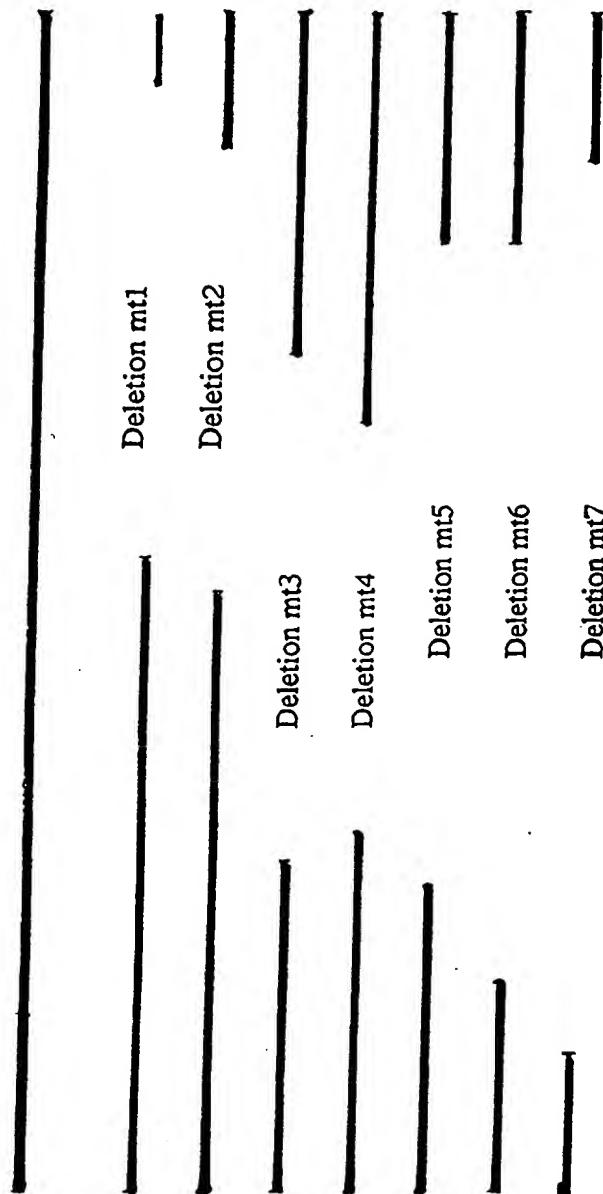
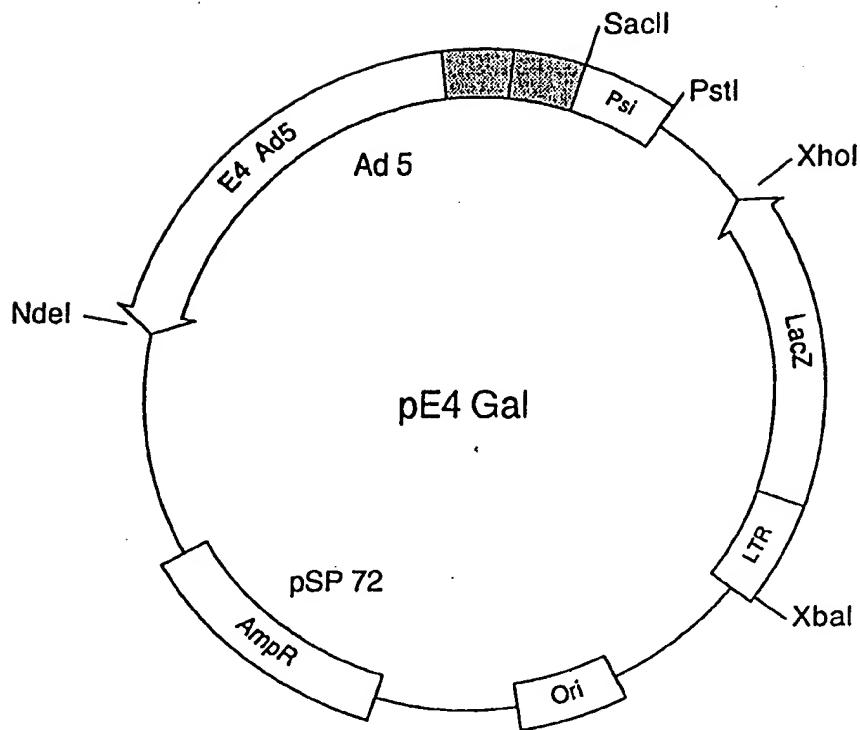


Figure 3



X

H2d1808

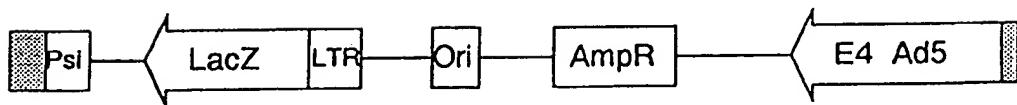
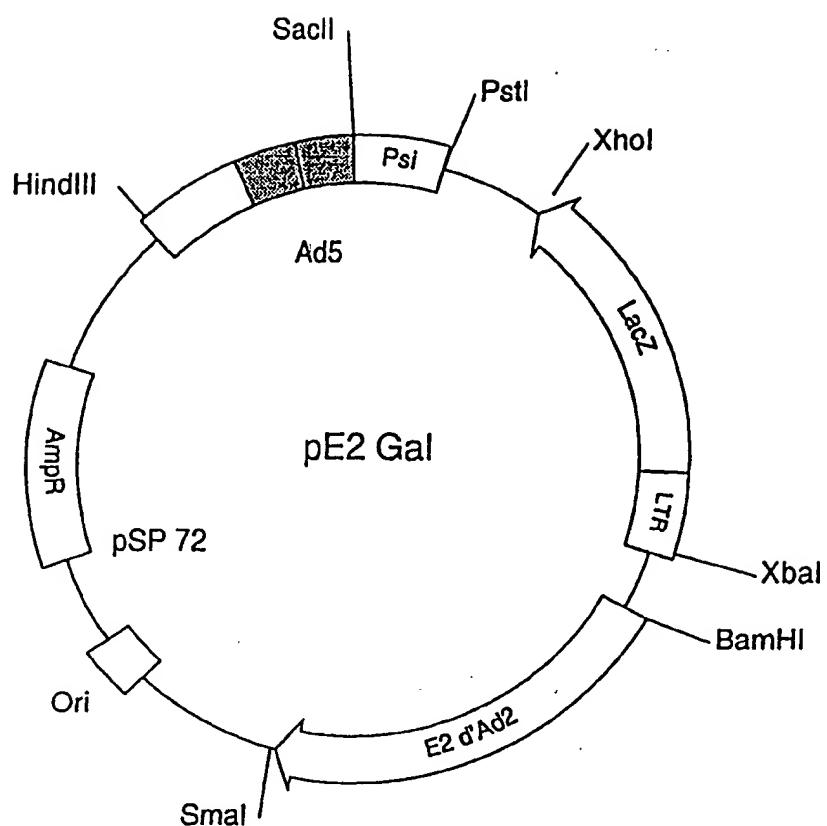


Figure 4



X

H2d1802

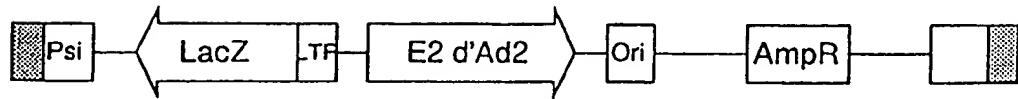


Figure 5

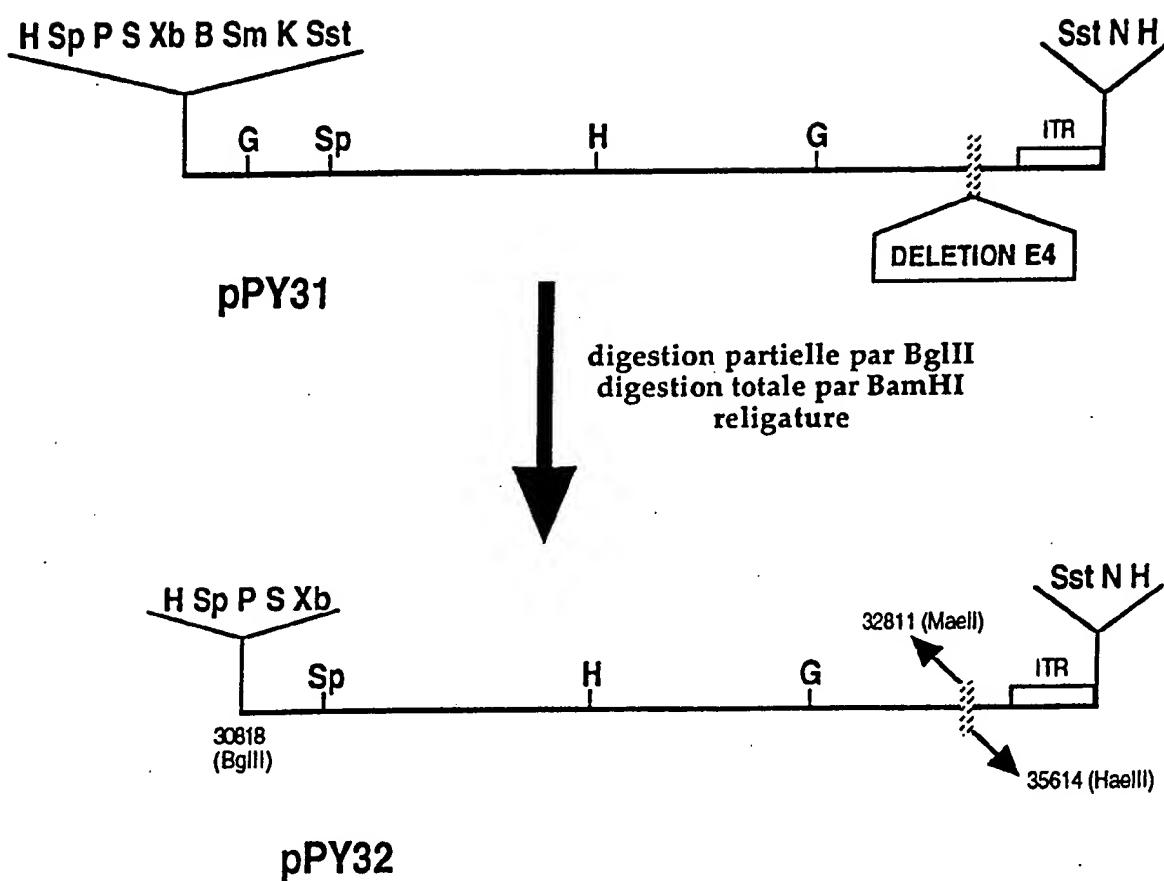


Figure 6

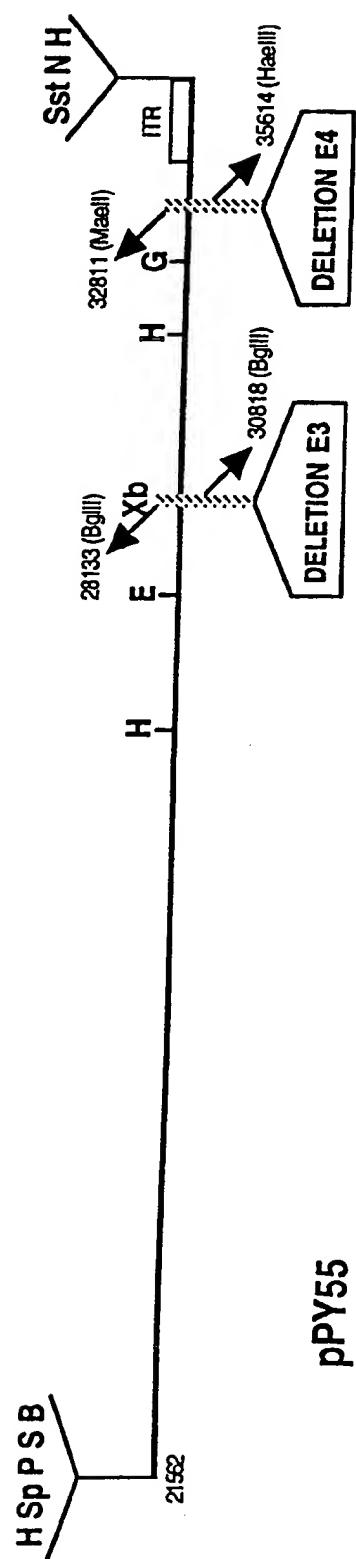


Figure 7

8/9

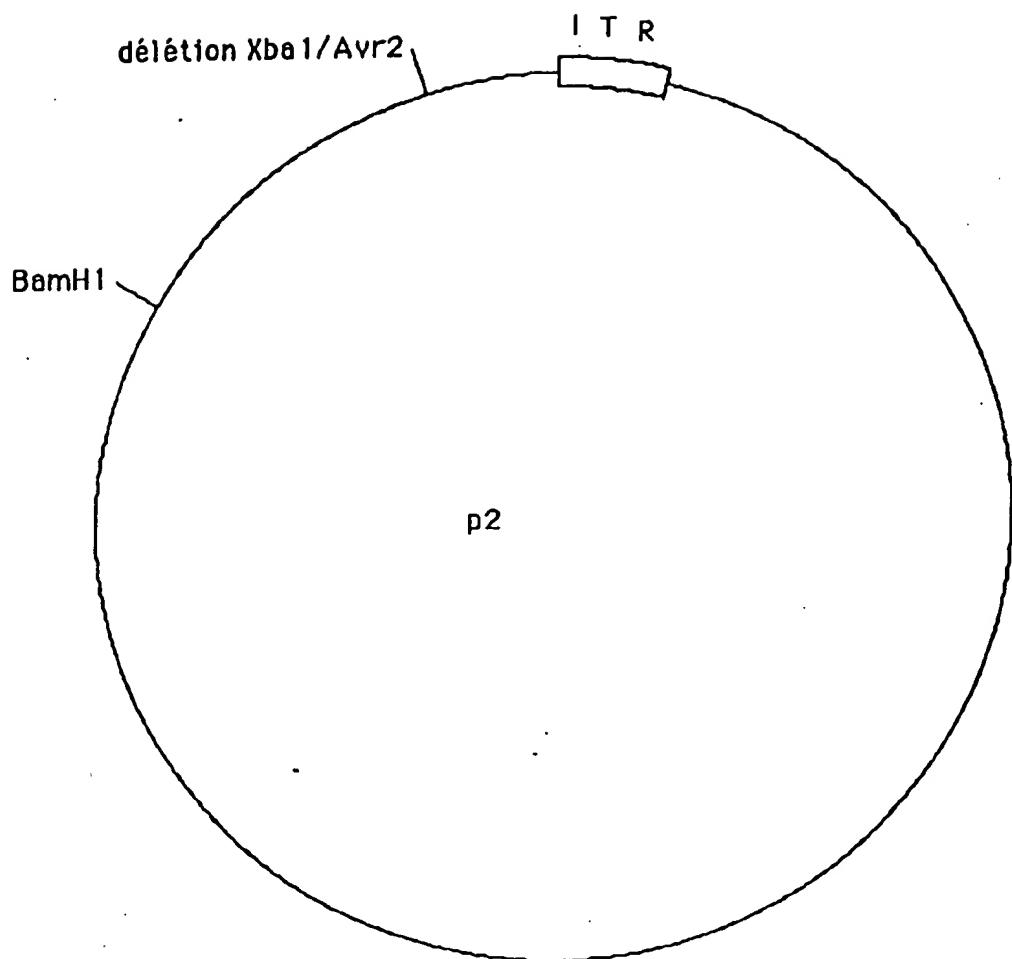


Figure 8

9/9

oligo contenant ATG de la fibre

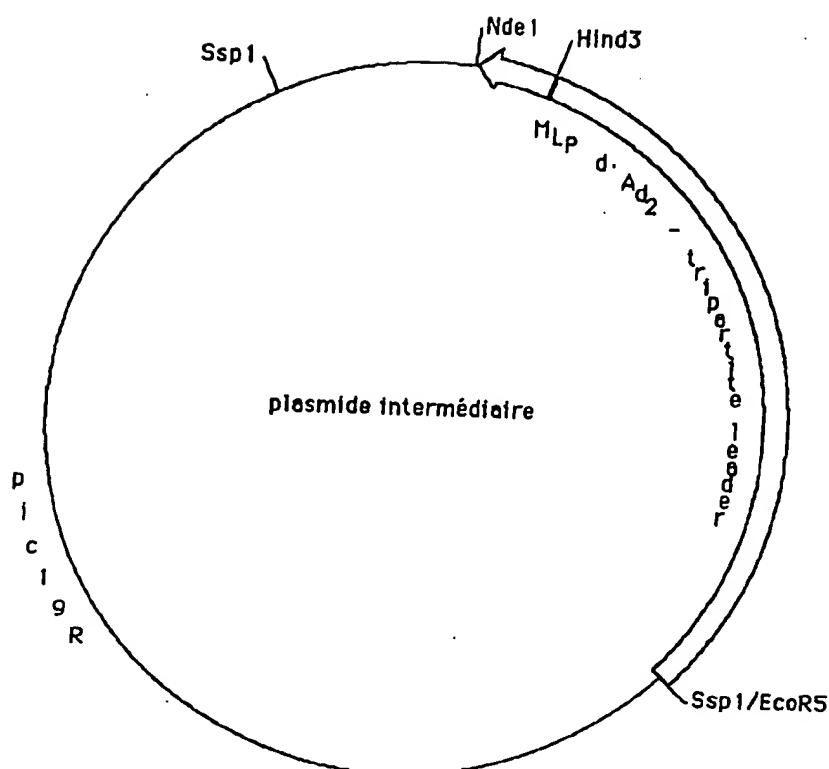


Figure 9

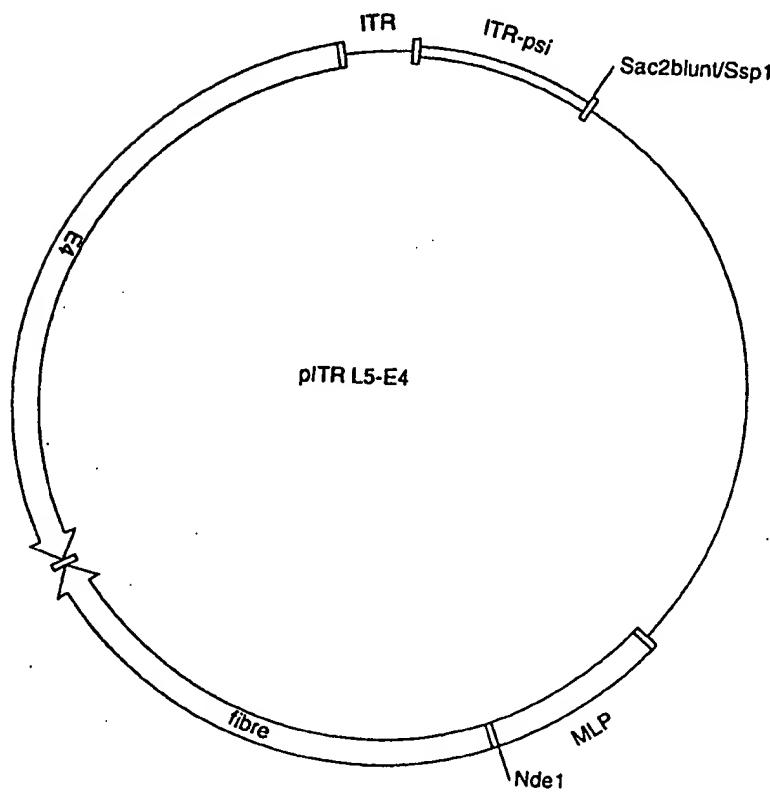


Figure 10

TRANSMISSION RESULT REPORT(FEB 29 '96 11:01AM).....

CELL GENESYS LEGAL 415 349 7392

(AUTO)

THE FOLLOWING FILE(S) ERASED

FILE	FILE TYPE	OPTION	TEL NO.	PAGE	RESULT
037	TRANSMISSION		12026865605	40	OK

ERRORS

1) HANG UP OR LINE FAIL 2) BUSY 3) NO ANSWER 4) NO FACSIMILE CONNECTION

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N15/34

C12N5/10

C12N7/04

C07K14/075

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP.) 9 June 1994 see the whole document ----	1-3, 5, 7, 9, 19, 28-30
A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, June 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2f requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' see page 2715, column 2, line 53 - line 62 ---- -/-	1

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 1994

Date of mailing of the international search report

21-09-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see page 58, paragraph 6 ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 80 , September 1983 , WASHINGTON US pages 5383 - 5386 WEINBERG, D.H. & KETNER, G. 'A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2' see the whole document ---	21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 8 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 3037 - 3047 KETNER, G. ET AL. 'Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids' ---	21
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B-	5734994	22-06-94
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A-	2681786	02-04-93
		AU-A-	2790292	27-04-93
		EP-A-	0559884	15-09-93
		JP-T-	6502771	31-03-94

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N15/34

C12N5/10

C12N7/04

C07K14/075

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP.) 9 Juin 1994 voir le document en entier --- A JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, Juin 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2f requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' voir page 2715, colonne 2, ligne 53 - ligne 62 --- -/-	1-3, 5, 7, 9, 19, 28-30 1

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

5 Septembre 1994

21-09-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 94/00851

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir page 58, alinéa 6 ----	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 80 , Septembre 1983 , WASHINGTON US pages 5383 - 5386 WEINBERG, D.H. & KETNER, G. 'A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2' voir le document en entier ----	21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 8 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 3037 - 3047 KETNER, G. ET AL. 'Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids' ----	21
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 Avril 1993 voir le document en entier -----	1

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B-	5734994	22-06-94
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A-	2681786	02-04-93
		AU-A-	2790292	27-04-93
		EP-A-	0559884	15-09-93
		JP-T-	6502771	31-03-94

PCT laying-open publication WO 95/02697, published Jan 26, 1995.

Int.Cl.(6): C12n 15/86, 15/34, 5/10, 7/04; C07k 14/075.
App. No. of intl. app.: PCT/FR94/00851. App. date: Jul 8, 1994.
Priority dates: Jul 13, 1993 (Fr. Pat. App. 93-08596),
Apr 18, 1994 (Fr. Pat. App. 94-04590).

Applicant (for all designated states other than US):
Rhone-Poulenc Rorer S.A. (FR/FR),
20, ave. Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

Inventors (inventors/applicants, for US):

Perricaudet, Michel (FR/FR),
31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR);
Vigne, Emmanuelle (FR/FR),
60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR);
Yeh, Patrice (FR/FR),
11-bis, rue Lacepède, F-75005 Paris (FR).

Designated states: AU, BB, BG, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK,
LV, MG, MN, MW, NO, NZ, FL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN;
Eur. Pat. (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE);
A IPO Pat. (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published with an international search report.

Title: Defective adenovirus vectors and use thereof in gene
therapy.

ABSTRACT

Novel viral vectors derived from adenoviruses, and the use
thereof in gene therapy, are disclosed.

(Fig. 4)

Title: Defective adenovirus vectors and use thereof in gene therapy.

The invention relates to novel viral vectors, preparation of same, and use of said vectors in genetic therapy. The invention further relates to pharmaceutical formulations comprised of said viral vectors. In particular, the invention relates to recombinant adenoviruses used in genetic therapy.

Genetic therapy is the correction of a deficiency or abnormality (mutation, aberrant expression, etc.) by introduction of genetic information into the affected cell or organ. The information may be introduced:

-- in vitro into a cell extracted from the organ, following which the modified cell is re-introduced into the organism; or
-- in vivo, into the appropriate tissue.

In the case of in vivo genetic therapy, various techniques are known, among which are the following:

-- various transfection techniques, using complexes of:
o DNA and DEAE-dextran (Pagano et al., 1 J.Virol. 891 (1967)) [("DEAE" is evidently diethylaminoethyl)];
o DNA and nuclear proteins (Kaneda et al., 243 Science 375 (1989));
o DNA and lipids (Felgner et al., 84 PNAS 7413 (1987));
-- the use of liposomes (Fraley et al., 255 J.Biol.Chem. 10431 (1980));

etc.

More recently, the use of viruses themselves as vectors for gene transfer has appeared as a promising alternative to these physical techniques of transfection. In this connection, various viruses have been tested for their capacity to infect certain cell populations. Particular examples of such viruses are the retroviruses (RSV, HMS, MMS, etc.), HSV, the adeno-associated viruses, and the adenoviruses.

Among these viruses, the adenoviruses in particular have certain important characteristics for use in genetic therapy. In particular, they have a very wide host spectrum, are capable of infecting quiescent cells, do not become integrated into the genome of the infected cell, and to date have not been associated with significant pathologies in humans.

The adenoviruses have linear double stranded DNA of length c. 36 kb. Their genome has

- an inverse repeated sequence (ITR) at its end,
- an encapsidation (so-called packaging) sequence, and
- early and late genes (see Fig. 1).

The principal early genes are the genes E1 (E1a and E1b), E2, E3, and E4. The principal late genes are the genes L1 to L5.

-- Page 2 --

The adenoviruses have already been used for in vivo transfer of genes, based on their characteristics mentioned above. For such gene transfer, various vectors derived from adenoviruses have been prepared, which incorporate various genes (β -gal, OTC, α -IAT, cytokines, etc.). In each of these viral vectors, the

adenovirus has been modified to render it incapable of replicating in the infected cell -- in the prior art, adenoviruses are described in which the E1 region (E1a and/or E1b) and possibly the E3 region has/have been deleted, and heterologous DNA sequences have been inserted at the same level (Levrero et al., 101 Gene 195 (1991); Gosh-Choudhury et al., 50 Gene 161 (1986)). However, the vectors described in the prior art have a number of drawbacks which limit their use in genetic therapy. In particular, all of the known vectors have a number of viral genes the expression of which in vivo is undesirable in the context of genetic therapy. Further, these vectors do not allow incorporation of DNA fragments of great length, such as may be required in certain applications.

The present invention enables these drawbacks to be remedied. The invention discloses recombinant adenoviruses for genetic therapy which are capable of effectively transferring DNA (in segments up to 30 kb) in vivo, expressing this DNA at high levels and in a stable manner in vivo, and essentially eliminating the risks of: producing viral proteins, transmitting the virus, pathogenicity, etc. In particular, it has been found that it is possible to substantially reduce the length of the adenovirus genome without impeding the formation of an encapsidated viral particle. This result is surprising, in that it has been observed for other viruses, e.g. retroviruses, that certain sequences distributed along the genome are necessary in order to achieve effective packaging of the viral particles.

That prior art observation has had the effect of strongly limiting attempts to devise vectors having major internal deletions. The present invention also demonstrates that the formation of such a viral particle is still possible despite suppression of essential functions of the viral genes. Moreover, the recombinant adenoviruses retain their advantageous properties of high infectiosity, stability in vivo, etc., even though they have suffered major modifications of their genome structure.

The inventive vectors are particularly advantageous in that they allow incorporation of desirable DNA sequences of great length, in particular greater than 30 kb. This is a particularly important property in treating certain pathologies where the treatment requires co-expression of a plurality of genes, or expression of very long genes. Thus, e.g.,

-- Page 3 --

in the case of muscular dystrophy, heretofore it has not been possible to transfer the cDNA segment corresponding to the native gene responsible for [remedyng] this pathology (dystrophin gene), because of the length of that segment (14 kb).

The inventive vectors are also very advantageous in that they have very little of the functional regions of the viruses. Accordingly, the risks generally inherent in using viruses as vectors in genetic therapy, e.g. immunogenicity, pathogenicity, transmission, replication, and recombination, are eliminated or at least substantially reduced.

Thus, the invention provides viral vectors which are

particularly well suited to transferring, and expressing in vivo, desirable DNA sequences.

A principal object of the invention is thus a defective recombinant adenovirus comprising:

- inverse repeated sequences (ITRs);
- a sequence enabling encapsidation (packaging sequence); and
- a heterologous DNA sequence;

and in which:

- the E1 gene is non-functional; and
- at least one of the genes E2, E4, and L1-L5 is non-functional.

In the context of the invention, the term "defective adenovirus" is defined as an adenovirus which is incapable of replicating autonomously in the target cell. Generally, the genome of a "defective adenovirus" according to the invention has at least been deprived of certain sequences needed for replication of the virus in the infected cell. This is accomplished by removing these regions (wholly or in part) or replacing them with other sequences (particularly a heterologous DNA sequence, as mentioned), or by rendering said regions ineffective.

The inverse repeated sequences (ITRs) are responsible for replication of the adenovirus. They are located at the 3' and 5' ends of the viral genome (see Fig. 1), where they can be readily isolated using classical biology techniques well known to a person skilled in the art. The nucleotide sequences of the ITRs

of some human adenoviruses, particularly the Ad2 and Ad5 serotypes, are known and are described in the literature, as are the corresponding sequences of some canine adenoviruses, particularly CAV1 and CAV2.

-- Page 4 --

For an Ad5 adenovirus, for example, the left-hand ITR sequence corresponds to the region comprising the 1st to the 103rd nucleotides of the genome (positions 1-103).

The packaging sequence (also called the Psi sequence) is needed for encapsidation of the viral DNA. Thus, this region must be present in order to enable preparation of the inventive defective recombinant adenoviruses. The packaging sequence is located in the genome of the adenovirus between the left ITR [lit., "TTR" -- evident misspelling of "ITR"] (at the 5' end) and the E1 gene (see Fig. 1). It may be isolated or may be artificially synthesized, using classical techniques of molecular biology. The sequences of nucleotides comprising the respective packaging sequences of some human adenoviruses, particularly the Ad2 and Ad5 serotypes, are known and are described in the literature, as are the corresponding sequences of some canine adenoviruses, particularly CAV1 and CAV2. For an Ad5 adenovirus, for example, the packaging sequence corresponds to the region comprising the 194th to the 358th nucleotide of the genome (positions 194 to 358).

There are various adenovirus serotypes, and these have different structures and properties. However, their genetic

organization is comparable; and the features taught in the present Patent Application can be readily reproduced by one skilled in the art for any type of adenovirus.

The adenoviruses according to the invention may be of human, animal, or mixed human and animal origin.

Regarding adenoviruses of human origin, it is preferred to use classes in group C. Among the serotypes of human adenoviruses it is particularly preferred to use type 2 or 5 adenoviruses (Ad2 or Ad5).

As mentioned above, the inventive adenoviruses may be of animal origin or may comprise sequences obtained from adenoviruses of animal origin. The present applicant has shown that adenoviruses of animal origin are well capable of infecting human cells but are incapable of propagating in the human cells in which they have been tested (see Fr. Pat. App. 93-05954). The applicant has also shown that adenoviruses of animal origin are not transcomplemented by adenoviruses of human origin; thus there is no risk of recombination and propagation in vivo in the presence of a human adenovirus, which can lead to formation of an infectious particle. The use of adenoviruses of animal origin, or regions of same, is

-- Page 5 --

thus particularly advantageous, because the risks inherent in using viruses as vectors in genetic therapy are thereby reduced.

Adenoviruses of animal origin usable within the scope of the present invention may be of canine, bovine, or murine origin

(see, e.g., Mavl, Beard, et al., 75 Virology 81 (1990)); or of ovine, porcine, aviary, or even simian origin (e.g. SAV). In particular, among the avian adenoviruses one might mention serotypes 1 to 10 available at ATCC (e.g. the following strains: VR-432 (Phelps), VR-280 (Fontes), VR-827 (P7-A), VR-828 (IBH-2A), VR-829 (J2-A), VR-830 (T8-A), VR-921 (K-11), or the comparison strains ("souches référencées") VR-831 to VR-835). Among the bovine adenoviruses, one might use various known serotypes, particularly serotypes 1 to 8 available at ATCC (VR-313, VR-314, VR-639 to VR-642, VR-768, and VR-769). One might also mention:

- murine adenoviruses ATCC VR-550 (FL) and VR-528 (E20308);
- ovine adenoviruses ATCC VR-1343 (Type 5) and VR-1340 (Type 6);
- porcine adenovirus [ATCC-]5359

[Translator's note: lit., just "5359)" -- evidently text has been deleted]; or

- simian adenoviruses, e.g. ATCC VR-591 to VR-594, VR-941 to VR-943, VR-195 to VR-203, etc.

Preferably, among the adenoviruses of animal origin, within the scope of the invention one uses adenoviruses or regions of same which are of canine origin, particularly strains of CAV2 adenoviruses (e.g. the Manhattan strain or the strain ATCC VR-800 (A26/61)). The canine adenoviruses have been the subject of numerous studies of viral structure. Complete restriction maps of CAV1 and CAV2 adenoviruses have been described in the prior

art (Spibey et al., 70 J.Gen.Virol. 165 (1989)), and the genes E1a and E3 and the ITR sequences have been cloned and sequenced (see esp. Spibey et al., 14 Virus Res. 241 (1989); and Linné, 23 Virus Res. 119 (1992), PCT WO 91/11525).

As indicated supra, the adenoviruses according to the invention have respective heterologous DNA sequences. The term "heterologous DNA sequence" indicates a DNA sequence introduced into the recombinant virus, wherewith the transfer into, or the expression in, the target cell has been studied.

In particular, a heterologous DNA sequence may comprise one or more therapeutic genes and/or one or more coding genes for antigenic peptides.

-- Page 6 --

The therapeutic genes which may be transferred thereby are genes of which the transcription and possible [sic] translation in the target cell produce(s) products having a therapeutic effect.

In particular, therapeutic genes may code for proteinaceous products having a therapeutic effect. A proteinaceous product thus coded may be a protein, a peptide, an amino acid, etc., and may be "homologous" with respect to the target cell, which is to say that it may be a product which is normally expressed in the target cell in the absence of a pathology. E.g., the expression of a protein may enable remediation of

- insufficient expression in the cell, or
- expression of a protein which is inactive or only weakly

active, as a consequence of [an undesirable] modification, or
-- overexpression of a [lit., "the said"] protein.

The therapeutic gene may code for a mutant of a cellular protein, having increased stability, modified activity, etc. The proteinaceous product may be heterologous with respect to the target cell. In such a case, e.g., a protein expressed may supply, enhance, or supplement an activity which is deficient in the cell, thereby enabling remediation of a pathology.

Among the therapeutic products envisioned in the present invention, one might mention in particular:

- enzymes;
- blood derivatives;
- hormones;
- lymphokines, such as interleukins, interferons, TNF (tumor necrosis factor), etc. (Fr. Pat. App. 92-03120);
- growth factors;
- neurotransmitters, or neurotransmitter precursors, or enzymes for synthesizing any of same;
- trophic factors, such as BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc.;
- apolipoproteins, such as ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc. (Fr. Pat. App. 93-05125);
- dystrophin, or a mini-dystrophin (Fr. Pat. App. 91-11947);

-- tumor suppressing factors [lit., "genes"], such as p53, Rb, RapIA, DCC, k-rev, etc.; and

-- factors [lit., "genes coding for factors"] involved in coagulation, such as factors VII, VIII, IX, etc.

The therapeutic gene may also be an antisense gene or sequence, the expression of which in the target cell enables the control of expression of genes or the control of transcription of cellular mRNA [(messenger RNA)] transcription. For example, such a sequence may be transcribed in the target cell into RNA species which are complementary to cellular mRNA species and which block the translation of the latter into protein(s), according to the technique described in Eur. Pat. 140,308.

As indicated supra, the heterologous DNA sequence may also comprise one or more genes which code for an antigenic peptide, capable of generating an antigenic response in a human. Such an embodiment of the invention enables production of vaccines for immunizing

-- Page 7 --

humans, e.g. against microorganisms or [sic] viruses. The antigenic peptides may be antigenic peptides which are specific with respect to Epstein-Barr virus, HIV virus, hepatitis B virus (Eur. Pat. 185,573), or pseudorabies virus; or specific with respect to tumors (Eur. Pat. 259,212).

In general, the heterologous DNA sequence also comprises sequences which enable expression of a therapeutic gene and/or a gene which codes for an antigenic peptide in the infected cell.

Such sequences may be sequences which are naturally responsible for expression of said gene(s) when said sequences are capable of functioning in the infected cell. The enabling sequences may also be of different origin, e.g. they may be sequences responsible for expression of other proteins or of synthetic proteins. In particular, the enabling sequences may be promotive sequences from genes of eukaryotes or viruses. They may be promotive sequences derived from the genome of the cell which is to be infected, or from the genome of a virus, which virus may be in particular the adenovirus employed. One might mention, e.g., the gene promoters E1A, MLP, CMV, RSV, etc. These sequences relating to expression may be modified by addition of sequences relating to activation, regulation, etc. If the gene inserted does not itself contain expressive sequences, it may be inserted in the genome of the defective virus such that it is governed by ("downstream of") such an expressive sequence.

The heterologous DNA sequence may also comprise a signal sequence affecting the passage of the synthesized product into the secretion system ("paths") of the target cell; in particular, said signal sequence may be disposed such that it governs ("is upstream of") the therapeutic gene. The signal sequence may be the natural signal sequence of the therapeutic product or any other functional signal sequence, or even an artificial signal sequence.

As indicated supra, the inventive vectors have at least one of their genes E2, E4, and L1-L5 non-functional. The viral

gene(s) in question can be rendered non-functional by any technique known to those skilled in the art; in particular, suppression, substitution, deletion, or addition, of one or more bases in the subject gene(s). Such modifications may be produced in vitro (on isolated DNA) or in vivo (e.g. by means of genetic engineering techniques, or even by treating with mutagenic means).

Among the mutagenic means which might be mentioned are, e.g., physical interventions such as higher-energy radiation (X-ray, gamma ray, ultraviolet, etc.), or

-- Page 8 --

chemical agents capable of reacting with various functional groups on the DNA bases (e.g. alkylating agents such as ethyl methanesulfonate (EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, and N-nitroquinoline-1-oxide (NQO)), bialkylating agents, intercalating agents, etc.

In the context of the invention, the term "deletion" means any suppression of the gene in question -- suppression of all or part of the coding region of said gene, and/or suppression of all or part of the region promoting transcription of said gene.

[Translator's note: For the sake of brevity, hereinbelow, "deletion in" means deletion in or with respect to, as just defined *supra*; and

"deletion of" means deletion of the entire gene, region, or sequence in question.]

The suppression may be carried out by digestion by means of

suitable restriction enzymes, followed by ligation according to classical techniques of molecular biology, as illustrated in the Examples infra.

The genetic modifications may also be produced by gene disruption, e.g. according to the protocol initially described by Rothstein (101 Meth. Enzymol 202 (1983)). In this method, all or part of the coding sequence is preferentially perturbed to enable replacement, by homologous recombination, of the genomic sequence by a non-functional or mutant sequence.

The genetic modification(s) may be localized in the coding part of the gene in question, or outside this region, e.g. in regions responsible for the expression and/or transcriptional regulation of said gene(s). The non-functional character of said gene(s) may thus be manifested by:

- production of a protein which is inactive by reason of structural or conformational modifications,
- non-production of a protein,
- production of a protein having an altered activity, or
- production of the natural protein at an attenuated level or according to a desired mode of regulation.

Certain alterations such as point mutations are by their nature capable of being corrected or attenuated by cellular mechanisms. Such genetic alterations are generally of less interest as to their practical applications. Rather, it is preferred that the non-functional character be entirely segregationally stable and/or irreversible.

Preferably, the gene is non-functional by reason of partial or total deletion [of said gene].

Preferably, the defective recombinant adenoviruses according to the invention have no late adenovirus genes.

A particularly advantageous embodiment of the invention consists of a defective recombinant adenovirus comprising:

-- Page 9 --

- inverse repeated sequences (ITRs);
- a sequence enabling encapsidation (packaging sequence);
- a heterologous DNA sequence; and
- a region containing all or a part of the gene E2.

Another particularly advantageous embodiment of the invention consists of a defective recombinant adenovirus comprising:

- inverse repeated sequences (ITRs);
- a sequence enabling encapsidation (packaging sequence);
- a heterologous DNA sequence; and
- a region containing all or a part of the gene E4.

According to a particularly advantageous embodiment, the inventive vectors have a functional gene E3 under the control of a heterologous promoter. Preferably, the vectors have a part of gene E3 which enables expression of the protein gp19K.

The defective recombinant adenoviruses according to the invention may be prepared by various methods.

A first method consists of transfecting DNA of the recombinant virus prepared in vitro (either by ligation or in

plasmid form) into a competent cell line, i.e. a cell line durably having all of the functions needed for complementation of the defective virus. Preferably, these functions are integrated in the genome of the cell, which enables the risks of recombination to be avoided and provides an increased measure of stability to the cell line. The preparation of such cell lines is described in the Examples, *infra*.

A second method consists of co-transfected

- DNA of the recombinant virus prepared *in vitro* (either by ligation or in plasmid form) and
- DNA of a helper virus,

into a suitable cell line. With this method, it is unnecessary to have a competent cell line capable of complementing all of the defective functions of the recombinant adenovirus. Some of these functions are complemented by the helper virus. The helper virus should itself be defective; the cell line will bear in trans the functions needed for complementing the helper virus. Preparation of inventive defective recombinant adenoviruses according to this method is also illustrated in the Examples.

-- Page 10 --

Among the cell lines which may be used in connection with this second approach, one might mention in particular: the human embryonic kidney line 293, KB, HeLa, MDCK, GHK, etc. (see the Examples).

The vectors which have been multiplied are then recovered, purified, and amplified according to classical techniques of

molecular biology.

To summarize: The invention also relates to cell lines infectable by adenoviruses, wherewith cells of said cell lines have, integrated into their genome, the functions needed for complementation of a defective recombinant adenovirus such as [the adenoviruses] described above. In particular, the invention relates to cell lines having integrated into their genome the regions E1 and E2 (particularly the region coding for the protein 72K) and/or E4, and/or the gene for the receptor of glucocorticoids. Preferably said lines are derived from the line 293 or the line gmDBP6.

The present invention further relates to any pharmaceutical formulation comprising one or more defective recombinant adenoviruses such as [the adenoviruses] described above. Pharmaceutical formulations according to the invention may be formulated for administration topically, orally, parenterally, intranasally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intraocularly, transdermally, etc.

Preferably, the pharmaceutical formulation comprises vehicles which are pharmaceutically acceptable for an injectable formulation. The formulation may in particular comprise a saline solution (monosodium phosphate, disodium phosphate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, magnesium chloride, etc.; or mixtures of these), a sterile solution, [and/or] an isotonic solution, and may further comprise dry components, particularly lyophilized components, which can be

formulated in injectable solutions by adding sterilized water or physiological serum, depending on the particular situation.

The doses of virus used for injection may be adjusted based on various parameters, particularly: the mode of administration, the pathology in question, the gene to be expressed, and the duration of treatment anticipated. In general, the recombinant adenoviruses according to the invention are formulated and administered in the form of doses in the range 10^4 - 10^{14} pfu/mL, preferably 10^6 - 10^{10} pfu/mL. The units of pfu (plaque-forming units) represent the infectivity of a solution of the virus, determined by infection of an appropriate cellular culture, wherewith, generally after 5 da, a measurement (count or the like) of the number of plaques of

-- Page 11 --

infected cells is made. The techniques for determining the pfu titre of a viral solution are well documented in the literature.

Using various inserted DNA sequences, the inventive adenoviruses may be used for treatment or prevention of a large number of pathologies, such as genetic disorders (muscular dystrophy and other dystrophies, cystic fibrosis, etc.), neurodegenerative disorders (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, ALS, etc.), pathologies connected with disorders of coagulation or dyslipoproteinemias, pathologies connected with viral infections (hepatitis, AIDS, etc.), etc.

The invention will be described more thoroughly with the aid of the Examples hereinbelow; these should be regarded as

illustrative, not limiting the scope of the invention.

Figures:

Fig. 1: Genetic organization (gene chart) of the adenovirus Ad5. The complete sequence of Ad5 is available on a database, enabling one skilled in the art to select or create any restriction site, and thus to isolate any region of the genome;

Fig. 2: Restriction map of the adenovirus CAV2, Manhattan strain (after Spibey et al., op. cit. [sic -- see citation *infra*]);

Fig. 3: Construction of defective viruses according to the invention, by ligation;

Fig. 4: Construction of a recombinant virus bearing the gene E4;

Fig. 5: Construction of a recombinant virus bearing the gene E2;

Fig. 6: Construction of, and diagram of, the plasmid pPY32;

Fig. 7: Diagram of the plasmid pPY55;

Fig. 8: Diagram of the plasmid p2;

Fig. 9: Diagram of the intermediary plasmid used in producing the plasmid pITRL5-E4;

Fig. 10: Diagram of the plasmid pITRL5-E4.

General techniques of molecular biology:

The classical methods used in molecular biology, such as preparative extractions of plasmidic DNA, centrifugation of plasmidic DNA in a cesium chloride gradient, electrophoresis on agarose gels or acrylamide gels, purification of DNA fragments by

electro-elution, extraction of proteins with phenol or phenol-chloroform [mixtures], precipitation of DNA in saline medium by

-- Page 12 --

ethanol or isopropanol, transformation in *Escherichia coli*, etc., are well known to those skilled in the art and are abundantly described in the literature (see, e.g.: Maniatis, T., et al., "Molecular cloning, a laboratory manual", pub. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982); and Ausubel, F.M., et al., eds., "Current protocols in molecular biology", pub. J. Wiley & Sons, NY (1987)).

The plasmids of type pBR322 and pUC, and the phages of series M13, were obtained from commercial sources (Bethesda Research Laboratories).

For ligation, the DNA fragments may be separated by length by electrophoresis on agarose gels or acrylamide gels, followed by extraction with phenol or a phenol-chloroform mixture, precipitation with ethanol, and incubation in the presence of DNA ligase of the phage T4 (supplied by Biolabs), according to the recommendations of the supplier.

The projecting 5' ends may be completed by the Klenow fragment of DNA polymerase I of *E. coli* (supplied by Biolabs), according to the specifications of the supplier. Projecting 5' ends may be degraded using the nuclease S1; projecting 3' ends may be degraded in the presence of DNA polymerase of the phage T4 (supplied by Biolabs), used according to the recommendations of

the supplier.

In vitro mutagenesis using synthetic oligodesoxynucleotides may be carried out according to the method developed by Taylor et al., 13 Nucleic Acids Res. 8749-8764 (1985), using the kit distributed by Amersham.

Enzymatic amplification of DNA fragments by PCR (Saiki, R.K., et al., "Polymerase-catalyzed chain reaction", in 230 Science 1350-1354 (1985); Mullis, K.B., and Faloona, F.A., 155 Meth. Enzym. 335-350 (1987)) may be carried out using a so-called DNA thermal cycler (supplied by Perkin Elmer Cetus), according to the specifications of the supplier.

The verification of nucleotide sequences may be performed by the method developed by Sanger et al., 74 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 5463-5467 (1977), using the kit distributed by Amersham.

Cell lines used:

In the Examples hereinbelow, the following cell lines were used (or could optionally be used):

-- Human embryonic renal cell line 293 (Graham et al., 36 J.Gen.Viro. 59 (1977)). This line notably contains, integrated into its genome, the left part of the genome of the human adenovirus AD5 (12%);

-- Page 13 --

-- Human cell line KB, from a human epidermal carcinoma (available from ATCC as CCL17); the conditions for culturing this line may be obtained from ATCC;

-- Human cell line HeLa [lit., "Hela"], from a human epithelial carcinoma (available from ATCC as CCL2); the conditions for culturing this line may be obtained from ATCC;

-- Canine cell line MDCK; the conditions for culturing this cell line were described, in particular, in Macatney et al, 44 Science 9 (1988);

-- Cell line gmDBP6 (Brough et al., 190 Virology 624 (1992)), comprised of HeLa cells bearing the E2 gene of [an] adenovirus under the control of the LTR [(long terminal repeat, here acting as a promoter)] of MMTV [(mouse mammary tumor virus)].

Examples:

Example 1:

This example demonstrates the feasibility of creating a recombinant adenovirus lacking essential functions of viral genes. To accomplish this, a series of deletion mutants of the adenovirus was constructed by in vitro ligation, and each of these mutants was co-transfected with a helper virus into KB cells. Since these cells do not allow the propagation of viruses having defective E1, transcomplementation occurred with regard to the E1 region.

The various deletion mutants were prepared from Ad5 adenovirus by digestion followed by in vitro ligation. To accomplish this, the viral DNA of the Ad5 was isolated using the technique described by Lipp et al. (63 J.Virol. 5133 (1989)), and was subjected to digestion in the presence of various restriction enzymes (see Fig. 3), then the product of the digestion was

ligated in the presence of T4 DNA ligase. The sizes of the various deletion mutants were then determined on 0.8% SDS agarose gel [(agarose gel with 0.8% sodium n-dodecyl sulfate)]. These mutants were then mapped (see Fig. 3). These various mutants comprise the following regions:

mt1: Ligation between fragments 0-20642(SauI) and (SauI)33797-35935 of Ad5;

mt2: Ligation between fragments 0-19549(NdeI) and (NdeI)31089-35935 of Ad5;

mt3: Ligation between fragments 0-10754(AatII) and (AatII)25915-35935 of Ad5;

mt4: Ligation between fragments 0-11311(MluI) and (MluI)24392-35935 of Ad5;

mt5: Ligation between fragments 0-9462(SalI) and (XhoI)29791-35935 of Ad5;

mt6: Ligation between fragments 0-5788(XhoI) and (XhoI)29791-35935 of Ad5;

mt7: Ligation between fragments 0-3665(SphI) and (SphI)31224-35935 of Ad5;

-- Page 14 --

Each of the mutants prepared above was co-transfected with viral DNA of Ad.RSV β Gal (Stratford-Perricaudet et al., 90 J.Clin.Invest. 626 (1992)) into KB cells, in the presence of calcium phosphate. The cells were harvested 8 days after transfection, and the culture supernatants were harvested and then amplified on KB cells until stocks of 50 dishes were

obtained for each transfection. The episomal DNA was isolated from each culture and separated using a cesium chloride gradient. In each case two distinct bands of virus were observed, removed, and analyzed. The heavier band corresponds to the viral DNA of Ad.RSV β Gal, and the lighter band to the DNA of the recombinant virus generated by ligation (Fig. 3). The titre obtained for the latter was approximately 10^8 pfu/mL.

A second series of deletion mutants of the adenovirus was constructed by in vitro ligation using the same methodology. These various mutants comprised the following regions:

mt8: Ligation between fragments 0-4623(ApaI) of Ad.RSV β Gal and (ApaI)31909-35935 of Ad5;

mt9: Ligation between fragments 0-10178(BglII) of Ad.RSV β Gal and (BamHI)21562-35935 of Ad5;

These mutants, carrying the LacZ gene under the control of the LTR promoter of the RSV virus, were then co-transfected into cells of the line 293 in the presence of the viral DNA of H2d1808 (Weinberg et al., 57 J.Virol. 833 (1986)) which DNA had deletion in the E4 region. According to this second technique, transcomplementation occurs with regard to E4 and not E1. This technique thus allows the generation, as described above, of recombinant viruses possessing only the E4 region as a viral gene.

Example 2:

This example describes the preparation of defective recombinant adenoviruses according to the invention by

co-transfection, with a helper virus, of the DNA of a recombinant virus incorporated into a plasmid.

To accomplish this, a plasmid carrying the ligating ITRs of Ad5, the packaging sequence, the E4 gene under the control of its own promoter, and, as a heterologous gene, the LacZ gene under the control of the LTR promoter of the RSV virus (Rous sarcoma virus), was constructed (Fig. 4). This plasmid, designated pE4Gal, was obtained by cloning and ligation of the following fragments (see Fig. 4):

-- Page 15 --

-- HindIII-SacII fragment from the pFG144 plasmid (Graham et al., 8 EMBO J. 2077 (1989)). This fragment carries the ITR sequences of Ad5 from cap to tail, and the packaging sequence; it consists of the fragment HindIII(34920)-SacII(352);

-- fragment of Ad5 between the SacII site (located at the level of base pair 3827) and the PstI site (located at the level of base pair 4245);

-- fragment of pSP 72 (supplied by Promega) between the PstI (bp 32) and SalI (bp 34) sites;

-- XhoI-XbaI fragment of the pAdLTR GalIX plasmid described by Stratford-Perricaudet et al. (90 JCI 626 (1992)). This fragment bears the LacZ gene under the control of the LTR of the RSV virus;

-- XbaI (bp 40) - NdeI (bp 2379) fragment of the plasmid pSP 72;

-- NdeI (bp 31089) - HindIII (bp 34930) fragment of Ad5.

This latter fragment, located in the right end of the Ad5 genome, contains the E4 region under the control of its own promoter. It was cloned at the level of the NdeI (2379) site of the plasmid pSP 72 and the HindIII site of the first fragment.

The subject plasmid was obtained by cloning the various fragments in the indicated regions of the plasmid pSP 72. It is understood that equivalent fragments can be obtained from other sources by a person skilled in the art.

The pE4Gal plasmid was then co-transfected with DNA of the virus H2d1808 into cells of [the line] 293 in the presence of calcium phosphate. The recombinant virus was then prepared as described in Example 1. This virus bears, as its only viral gene, the E4 gene of the Ad5 adenovirus (Fig. 4). Its genome has a size of approximately 12 kb, which allows the insertion of heterologous DNA of very large size (up to 20 kb). Thus, a person skilled in the art can easily replace the LacZ gene with any other therapeutic gene such as those mentioned above. Note that this virus has certain sequences from the plasmid pSP 72 which sequences can be eliminated using ordinary molecular biology techniques if necessary.

Example 3:

This example describes the preparation of another defective recombinant adenovirus according to the invention by co-transfection, with a helper virus, of the DNA of the recombinant virus incorporated into a plasmid.

To accomplish this, a plasmid carrying the ligating ITRs of

Ad5, the packaging sequence, the E2 gene of Ad2 under the control of its (said gene's) own promoter, and, as

-- Page 16 --

a heterologous gene, the LacZ gene under the control of the LTR promoter [sequence] of the RSV virus, was constructed (Fig. 5). This plasmid, designated pE2Gal, was obtained by cloning and ligation of the following fragments (see Fig. 5):

-- HindIII-SacII fragment from the pFG144 plasmid (Graham et al., 8 EMBO J. 2077 (1989)). This fragment bears the Ad5 ITR sequences from cap to tail, and the packaging sequence; it consists of the fragment HindIII(34920) - SacII(352). It was cloned, along with the following fragment, at the level of the HindIII (16) - PstI (32) sites of the plasmid pSP 72;

-- fragment of Ad5 between the SacII site (located at the level of base pair 3827) and the PstI site (located at the level of base pair 4245). This fragment was cloned at the level of the SacII site of the preceding fragment and the PstI(32) site of the plasmid pSP 72;

-- fragment of pSP 72 (supplied by Promega) between the PstI (bp 32) and SalI (bp 34) sites;

-- XhoI-XbaI fragment of the pAdLTR GalIX plasmid described by Stratford-Perricaudet et al. (90 JCI 626 (1992)). This fragment bears the LacZ gene under the control of the LTR [promoter sequence] of the RSV virus. It was cloned at the level of the SalI (34) and XbaI [(site base pair not stated)] sites of the plasmid pSP 72.

-- fragment of pSP 72 (supplied by Promega) between the XbaI (bp 34) and BamHI (bp 46) sites;

-- BamHI (bp 21606) - SmaI (bp 27339) fragment of the Ad2.

This fragment of the genome of the Ad2 [virus] contains the E2 region under the control of its own promoter. It was cloned at the level of the BamHI (46) and EcoRV [(site base pair not stated)] sites of the plasmid pSP 72;

-- EcoRV (bp 81) - HindIII (bp 16) fragment of the plasmid pSP 72.

This plasmid was obtained by cloning the various fragments in the indicated regions of the plasmid pSP 72. It is understood that equivalent fragments can be obtained from other sources by a person skilled in the art.

The pE2Gal plasmid was then co-transfected with DNA of the virus H2d1802 lacking the E2 region (Rice et al., 56 J.Virol. 767 (1985)), into cells of line 293 in the presence of calcium phosphate. The recombinant virus was then prepared as described in Example 1. This virus bears, as its only viral gene, the E2 gene of the Ad2 adenovirus (Fig. 5). Its genome has a length of approximately 12 kb, which allows the insertion of heterologous DNA of substantial size (up to 20 kb). Thus, a person skilled in the art can easily replace the LacZ gene with any other therapeutic gene such as those mentioned above. Note that this virus has certain sequences

-- Page 17 --

from the intermediate plasmid which sequences can be eliminated

using ordinary molecular biology techniques if necessary.

Example 4:

This example describes the construction of cell lines complementing for the E1, E2, and/or E4 regions of adenoviruses. These lines permit the construction of recombinant adenoviruses according to the invention, with deletion in those regions, without the use of a helper virus. These viruses are obtained by recombination *in vivo*, and can include important heterologous sequences.

In the cell lines described, the E2 and E4 regions, which are potentially cytotoxic, are placed under the control of an inducible promoter, consisting of

-- the LTR of MMTV (supplied by Pharmacia), which is induced by dexamethasone, [which LTR is] either native or in the minimal form described in 90 PNAS 5603 (1993); or

-- the system repressible by tetracycline described by Gossen and Bujard (89 PNAS 5547 (1992)).

It is understood that other promoters can be used, and particularly variants of the MMTV LTR having, e.g., heterologous regulation regions (particularly an "enhancer" region). The lines according to the invention were constructed by transfection of the corresponding cells, in the presence of calcium phosphate, by a fragment of DNA carrying the genes indicated (adenovirus gene regions and/or a glucocorticoid receptor gene region) under the control of a transcription promoter and a terminator (polyadenylation site). The terminator can be either the natural

terminator of the transfected gene, or a different terminator such as for example the terminator of the SV40 virus early messenger. Advantageously, the DNA fragment also bears a gene permitting selection (isolation) of the transformed cells, for example the gene for resistance to geneticin. The resistance gene can also be carried by a different fragment of DNA, co-transfected with the first.

After transfection, the transformed cells were selected and their DNA was analyzed to verify the integration of the DNA fragment into the genome.

This technique allows one to obtain the following cell lines:

1. Cells of the line 293 having the 72K gene from the E2 region of Ad5, which gene is under the control of the MMTV LTR;
2. Cells of 293 having the 72K gene from the E2 region of Ad5, under the control of the MMTV LTR, and further having the glucocorticoid receptor gene;
3. Cells of 293 having the 72K gene from the E2 region of Ad5, under the control of the MMTV LTR, and further having the E4 region [of Ad5], under the control of the MMTV LTR;
4. Cells of 293 having the 72K gene from the E2 region of Ad5, under the control of the MMTV LTR, further having the E4 region [of Ad5], under the control of the MMTV LTR, and having the glucocorticoid receptor gene;

-- Page 18 --

5. Cells of 293 having the E4 region [of Ad5], under the control of the MMTV LTR;

6. Cells of 293 having the E4 region [of Ad5], under the control of the MMTV LTR, and having the glucocorticoid receptor gene;

7. Cells of the line gmDBP6, having the E1A and E1B regions [of Ad5], under the control of their own promoter;

8. Cells of gmDBP6 having the E1A and E1B regions [of Ad5], under the control of their own promoter, and having the E4 region [of Ad5], under the control of the MMTV LTR.

Example 5:

This example describes the preparation of defective recombinant adenoviruses according to the invention, with genomes having deletions in genes E1, E3, and E4. According to an advantageous embodiment, illustrated in this example and in Example 3, the genomes of recombinant adenoviruse's according to the invention are modified in such a way that at least the E1 and E4 genes are non-functional. Such adenoviruses possess first of all an ability to incorporate important heterologous genes. Furthermore, these vectors offer increased safety because of the deletion in the E4 region, which region is involved in regulating the expression of late genes, stabilizing late nuclear RNAs, suppressing the expression of host cell proteins, and facilitating efficient replication of the viral DNA. These vectors therefore have greatly reduced natural variability ("noise") in the transcription and expression of viral genes.

Finally, it is advantageous that these vectors can be produced at titres comparable to wild adenoviruses.

The subject adenoviruses were prepared from the pPY55 plasmid, carrying the modified right part of the Ad5 adenovirus genome, the preparation being either by co-transfection with a helper plasmid (see also Examples 1, 2, and 3) or by means of a complementing line (Example 4).

5.1. Construction of the pPY55 plasmid:

a) Construction of the pPY32 plasmid:

-- Page 19 --

The AvrII - BcII fragment of the pFG144 plasmid (Graham, F.L., et al., 8 EMBO J. 2077-2085 (1989)), corresponding to the right end of the Ad5 adenovirus genome, was first cloned between the XbaI and BamHI sites of the pIC19H vector, prepared from a dam- context [(shortened defective adenine methylase gene)]. This generated the pPY23 plasmid. An interesting characteristic of the pPY23 plasmid is that the SalI site originating from the cloning multisite of the pIC19H vector remains unique and is located next to the right end of the Ad5 adenovirus genome. The HaeIII - SalI fragment of the pPY23 plasmid which contains the right end of the Ad5 adenovirus genome, beginning at the HaeIII site located at position 35614, was then cloned between the EcoRV and XhoI sites of the pIC20H vector, which generated the pPY29 plasmid. An interesting characteristic of this plasmid is that the XbaI and ClaI sites originating from the cloning multisite of the pIC20H vector are

located next to the EcoRV/HaeIII junction that results from the cloning. In addition, this junction modifies the nucleotide context immediately adjacent to the ClaI site, which has now become methylatable in a *dam*⁺ context. The XbaI (30470) - MaeII (32811) fragment of the Ad5 adenovirus genome was then cloned between the XbaI and ClaI sites of the pPY29 plasmid prepared from a *dam*⁻ context, which generated the pPY30 plasmid. Finally the SstI fragment of the pPY30 plasmid, which corresponds to the sequence of the Ad5 adenovirus genome from

-- the SstI site in position 30556 to

-- the right end,

was cloned between the SstI sites of the pIC20H vector, which generated the pPY31 plasmid, for which a restriction map of the insert located between the HindIII sites is given in Fig. 6.

The pPY32 plasmid was obtained after partial digestion of the pPY31 plasmid by BglII, followed by total digestion by BamHI, then re-ligation. The pPY32 plasmid thus corresponds to the deletion in the Ad5 adenovirus genome situated between the BamHI site of the pPY31 plasmid and the BglII site located at position 30818. A restriction map for the HindIII fragment of the pPY32 plasmid is given in Fig. 6. A characteristic of the pPY32 plasmid is that it has unique SalI and XbaI sites.

b) Construction of the pPY47 plasmid:

The BamHI(21562) - XbaI(28592) fragment of the Ad5 adenovirus genome was first cloned between the BamHI and XbaI sites of the pIC19H vector, prepared from a *dam*⁻ context, which

generated the pPY17 plasmid. This fragment therefore contained a HindIII(26328) - BglII(21833) fragment of the Ad5 adenovirus genome, which can be cloned between the HindIII and BglII sites of the pIC20R vector to generate the

-- Page 20 --

pPY34 plasmid. A characteristic of this plasmid is that the BamHI site originating from the cloning multisite is located in the immediate proximity of the HindIII(26328) site of the Ad5 adenovirus genome.

The BamHI(21562) - HindIII(26328) fragment of the Ad5 adenovirus genome from the pPY17 plasmid was then cloned between the BamHI and HindIII sites of the pPY34 plasmid, which generated the pPY39 plasmid. The BamHI - XbaI fragment of the pPY39 plasmid prepared from a dam- context, which contained the part of the Ad5 adenovirus genome between the BamHI(21562) and BglII(28133) sites, was then cloned between the BamHI and XbaI sites of the pIC19H vector prepared from a dam- context. This generated the pPY47 plasmid, an interesting characteristic of which is that the SalI site originating from the cloning multisite is located near the HindIII site (Fig. 7).

c) Construction of the pPY55 plasmid

The SalI - XbaI fragment of the pPY47 plasmid prepared from a dam- context, and which contains the part of the Ad5 adenovirus genome from the BamHI(21562) site to the BglII(28133) site, was cloned between the SalI and XbaI sites of the pPY32 plasmid, which generated the pPY55 plasmid. This plasmid can be used

directly to obtain recombinant adenoviruses with deletion in at least the E3 region (deletion between the BglII sites located at positions 28133 and 30818 of the Ad5 adenovirus genome) and with deletion of the entire E4 region (deletion between the MaeII(32811) and HaeIII(35614) sites of the Ad5 adenovirus genome) (Fig. 7).

5.2. Preparation of adenoviruses with at least one deletion in the E4 region, and preferably in at least the E1 and E4 regions:

a) Preparation by co-transfection with an E4 helper virus into cells of [the line] 293:

The principle employed is based on transcomplementation between a "mini-virus" (helper virus) expressing the E4 region and a recombinant virus with deletion in at least E3 and E4. These viruses are obtained either by *in vitro* ligation or after *in vivo* recombination, according to the following strategies:

-- Page 21 --

(i) DNA of the Ad-d1324 virus (Thimmappaya et al., 31 Cell 543 (1982)) and the pPY55 plasmid, both digested by BamHI, are first ligated *in vitro*, then co-transfected with the pE4Gal plasmid (described in Example 2) into cells of 293.

(ii) DNA of the Ad-d1324 virus digested by EcoRI, and the pPY55 plasmid digested by BamHI, are co-transfected, with the pE4Gal plasmid, into cells of 293.

(iii) DNA of the Ad5 adenovirus and the pPY55 plasmid, both digested by BamHI, are ligated and then are co-transfected with the pE4Gal plasmid into cells of 293.

(iv) DNA of the Ad5 adenovirus digested by EcoRI and the pPY55 plasmid digested by BamHI are co-transfected with the pEAGal [sic -- evidently the plasmid pE4Gal] into cells of 293.

Strategies (i) and (ii) allow the generation of a recombinant adenovirus with deletion in regions E1, E3, and E4; strategies (iii) and (iv) allow the generation of a recombinant adenovirus with deletion in regions E3 and E4. Of course, the DNA of a recombinant virus with deletion in the E1 region but expressing some transgene can be used in place of the Ad-d1324 viral DNA according to strategy (i) or (ii), in order to generate a recombinant virus having deletion in regions E1, E3, and E4 and expressing the said transgene.

b) Preparation by means of cell lines which transcomplement the E1 and E4 functions:

The principle here is based on the fact that a cell line derived from a line which expresses the E1 region, for example the 293 line, and which also expresses at least the ORF6 and ORF6/7 open phases of the E4 region of the Ad5 adenovirus under the control of a promoter, e.g. an inducible promoter, is able to transcomplement both the E1 and E4 regions of the Ad5 adenovirus. Such cell lines were described in Example 4.

A recombinant virus with deletion in regions E1, E3, and E4 can thus be obtained by in vitro ligation or by in vivo

recombination according to the protocols described above. Regardless of the protocol used to generate viruses with deletion in at least region E4, a cytopathic effect (indicating the production of recombinant viruses) was observed after transfection into the cells used. The cells were then harvested, disrupted by three cycles of freezing and thawing in their supernatant, then centrifuged at 4,000 RPM for 10 minutes. The supernatant obtained was then amplified on fresh cell culture (cells of 293 for the protocols 5.2(a) and cells of 293 expressing the E4 region

-- Page 22 --

for the protocol 5.2(b)). The viruses were then purified from plaques and their DNA was analyzed using the method of Hirt (cited supra [sic]). Stocks of the viruses were then prepared on a cesium chloride gradient.

Example 6:

This example describes the preparation of defective recombinant adenoviruses according to the invention, with genomes having deletions in the E1, E3, L5, and E4 genes. These vectors are particularly advantageous since the L5 region codes for fibre (fibrous protein), which is a protein that is extremely toxic to the cell.

These adenoviruses were prepared from the p2 plasmid carrying the modified right part of the Ad5 adenovirus genome, by co-transfection with various helper plasmids. They can also be prepared by means of a complementing line.

6.1. Construction of the p2 plasmid:

This plasmid contains the entire right region of the Ad5 adenovirus genome, beginning at the BamHI(21562) site, from which the fragment between the XbaI(28592) and AvrII(35463) sites, bearing the E3, L5, and E4 genes, has been deleted. The p2 plasmid is obtained by cloning and ligation of the following fragments in the pIC19R plasmid linearized with BamHI and dephosphorylated (see Fig. 8):

-- fragment of the Ad5 adenovirus genome between the BamHI(21562) and XbaI(28592) sites, and

-- right end of the Ad5 adenovirus genome (containing the right ITR), from the AvrII(35463) site to the BclI (BamHI compatible) site.

6.2. Construction of a helper plasmid (pITRL5-E4) carrying the L5 gene:

The pITRL5-E4 helper plasmid bears the E4 and L5 genes in trans. It corresponds to the pE4Gal plasmid described in Example 2, containing in addition the L5 region which codes for fibre, under the control of the Ad2 adenovirus promoter MLP. The pITRL5-E4 plasmid was constructed in the following manner (Figs. 9 and 10):

A 58 bp oligonucleotide was synthesized which contained, in the 5'-3' direction: an HindIII site, the fibre ATG, and the fibre-coding sequence, extending to the NdeI site at position 31089 of the Ad5 adenovirus genome. The sequence of this oligonucleotide is given below, in the 5'-3' direction:

after in vivo recombination, according to the following strategies:

(i) DNA of the Ad-dl324 virus (Thimmappaya et al., 31 Cell 543 (1982)), and the p2 plasmid, both digested by BamHI, were first ligated in vitro, then co-transfected with the pITRL5-E4 helper plasmid (Example 6.2) into cells of 293.

(ii) DNA of the Ad-dl324 virus digested by EcoRI, and the p2 plasmid digested by BamHI, were co-transfected, with the pITRL5-E4 plasmid, into cells of 293.

(iii) DNA of the Ad5 adenovirus, and the p2 plasmid, both digested by BamHI, were ligated and then co-transfected with the pITRL5-E4 plasmid into cells of 293.

(iv) DNA of the Ad5 adenovirus, digested by EcoRI, and the p2 plasmid digested by BamHI, were co-transfected with the pITRL5-E4 plasmid into cells of 293.

-- Page 24 --

Strategies (i) and (ii) allow the generation of a recombinant adenovirus with deletion in regions E1, E3, L5, and E4; strategies (iii) and (iv) allow the generation of a recombinant adenovirus with deletion in regions E3, L5, and E4. Of course, DNA of a recombinant virus with deletion in the E1 region but expressing a transgene of some type can be used in place of the Ad-dl324 virus DNA according to strategies (i) and (ii), in order to generate a recombinant virus with deletion in regions E1, E3, L5, and E4 and expressing said transgene.

The protocols described above can also be carried out with a

helper virus that bears only the L5 region, using a cell line capable of expressing the E1 and E4 regions of the adenovirus, as described in Example 4.

Furthermore, it is also possible to use a complementing line capable of expressing the E1, E4, and L5 regions, which would obviate the use of a helper virus.

After transfection, the viruses produced are recovered, amplified, and purified, under the conditions described in Example 5.

##

Figures:

Figures are replacements, pursuant to PCT Rule 26.

KEY to Fig. 6: (a) Partial digestion by BgIII;
(b) Total digestion by BamHI; (c) Religation;
(d) Deletion in (or of) E4.

KEY to Fig 9: (a) Oligonucleotide containing ATG initiating sequence for fibre; (b) MLP promoter of Ad2 / tripartite leader; (c) Intermediary plasmid.

[N.B.: Hind3 is the same as HindIII (etc. etc.).]

##

Claims:

1. A defective recombinant adenovirus, comprising:
 - inverse repeated sequences (ITRs);
 - a sequence enabling encapsidation (packaging sequence); and
 - a heterologous DNA sequence;and in which:
 - the E1 gene is non-functional; and
 - at least one of the genes E2, E4, and L1-L5 is non-functional.
2. An adenovirus according to claim 1; characterized in that it is of human, animal, or mixed [human and animal] origin.
3. An adenovirus according to claim 2; characterized in that the adenovirus of human origin is chosen from among classes in group C, preferably from the adenoviruses of type 2 or 5 (Ad2 or Ad5).
4. An adenovirus according to claim 2; characterized in that the adenovirus of animal origin is chosen from among the adenoviruses of canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviary, and simian origin.
5. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that at least the genes E1 and E4 are non-functional.

[Translator's note: Here and hereinbelow, "one of the preceding claims" is understood to mean "one (or more) of the preceding claims".]

6. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that it lacks late genes.
7. An adenovirus according to claim 1; characterized in that it is comprised of:
 - inverse repeated sequences (ITRs);
 - a sequence enabling encapsidation (packaging sequence);
 - a heterologous DNA sequence; and
 - a region containing all or a part of the gene E2.
8. An adenovirus according to claim 1; characterized in that it is comprised of:
 - inverse repeated sequences (ITRs);
 - a sequence enabling encapsidation (packaging sequence);
 - a heterologous DNA sequence; and
 - a region containing all or a part of the gene E4.

-- Page 26 --

9. An adenovirus according to claim 1; characterized in that its genome has deletion (or other suppression) in, of, or with respect to the genes E1, E3, and E4.
[Translator's note: See definition of "deletion" (which subsumes other suppression), Engl. p. 13, *supra*.]
10. An adenovirus according to claim 1; characterized in that its genome has deletion (or other suppression) in, of, or with respect to the genes E1, E3, L5, and E4.
11. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that in addition it is comprised of a functional E3 gene under control of a heterologous promoter.

12. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that the heterologous DNA sequence is comprised of one or more therapeutic genes and/or one or more genes which code for antigenic peptides.

13. An adenovirus according to claim 12; characterized in that the therapeutic gene is chosen from among the codons for

- enzymes;
- blood derivatives;
- hormones;
- lymphokines, such as interleukins, interferons, TNF (tumor necrosis factor), etc.;
- growth factors;
- neurotransmitters, or neurotransmitter precursors, or enzymes for synthesizing any of same;
- trophic factors, such as BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc.;
- apolipoproteins, such as ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc.;
- dystrophin, or a mini-dystrophin;
- tumor suppression; and
- factors involved in coagulation, such as factors VII, VIII, IX, etc.

[Go to next page.]

14. An adenovirus according to claim 12; characterized in that the therapeutic gene is a gene or an antisense sequence, the expression of which gene or sequence in the target cell enables control of the expression of genes or control of the transcription of cellular mRNA.

15. An adenovirus according to claim 12; characterized in that the gene in question codes for an antigenic peptide capable of generating an immune response in a human, against microorganisms or viruses.

16. An adenovirus according to claim 15; characterized in that the gene in question codes for an antigenic peptide specific with respect to Epstein-Barr virus, HIV virus, hepatitis B virus, or pseudorabies virus, or specific with respect to tumors.

17. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that the heterologous DNA sequence also comprises sequences which enable

-- Page 27 --

expression of the therapeutic gene and/or the gene which codes for the antigenic peptide, in the infected cell.

18. An adenovirus according to one of the preceding claims; characterized in that the heterologous DNA sequence comprises a signal sequence which governs the passage of the synthesized product into the secretion system ("paths") of the target cell; in particular, said signal sequence may be disposed such that it is operative earlier than ("upstream of") the therapeutic gene.

19. A cell line subject to infection by an adenovirus, which cell line has integrated into its genome the functions needed for complementing a defective recombinant adenovirus claimed according to one of claims 1 to 18.

20. A cell line according to claim 19; characterized in that it comprises in its genome at least the genes E1 and E2 of an adenovirus.

21. A cell line according to claim 20; characterized in that it further comprises the gene E4 of an adenovirus.

22. A cell line according to claim 19; characterized in that it comprises in its genome at least the genes E1 and E4 of an adenovirus.

23. A cell line according to claims 19 to 22; characterized in that it further comprises the gene of a receptor of glucocorticoids.

24. A cell line according to claims 19 to 23; characterized in that the genes E2 and E4 are under the control of an inducible promoter.

25. A cell line according to claim 24; characterized in that the inducible promoter is the promoter LTR of MMTV.

26. A cell line according to claims 19 to 25; characterized in that the gene E2 codes for the protein 72 K.

27. A cell line according to claims 19 to 26; characterized in that it is derived from the cell line 293.

28. A pharmaceutical composition comprised of at least one defective recombinant adenovirus according to one of claims 1 to 18.

-- Page 28 --

29. A pharmaceutical composition according to claim 28; comprised of a recombinant adenovirus according to one of claims 5 to 10.

30. A pharmaceutical composition according to claim 28 or 29; comprised of a vehicle which is pharmaceutically acceptable for an injectable formulation.

####

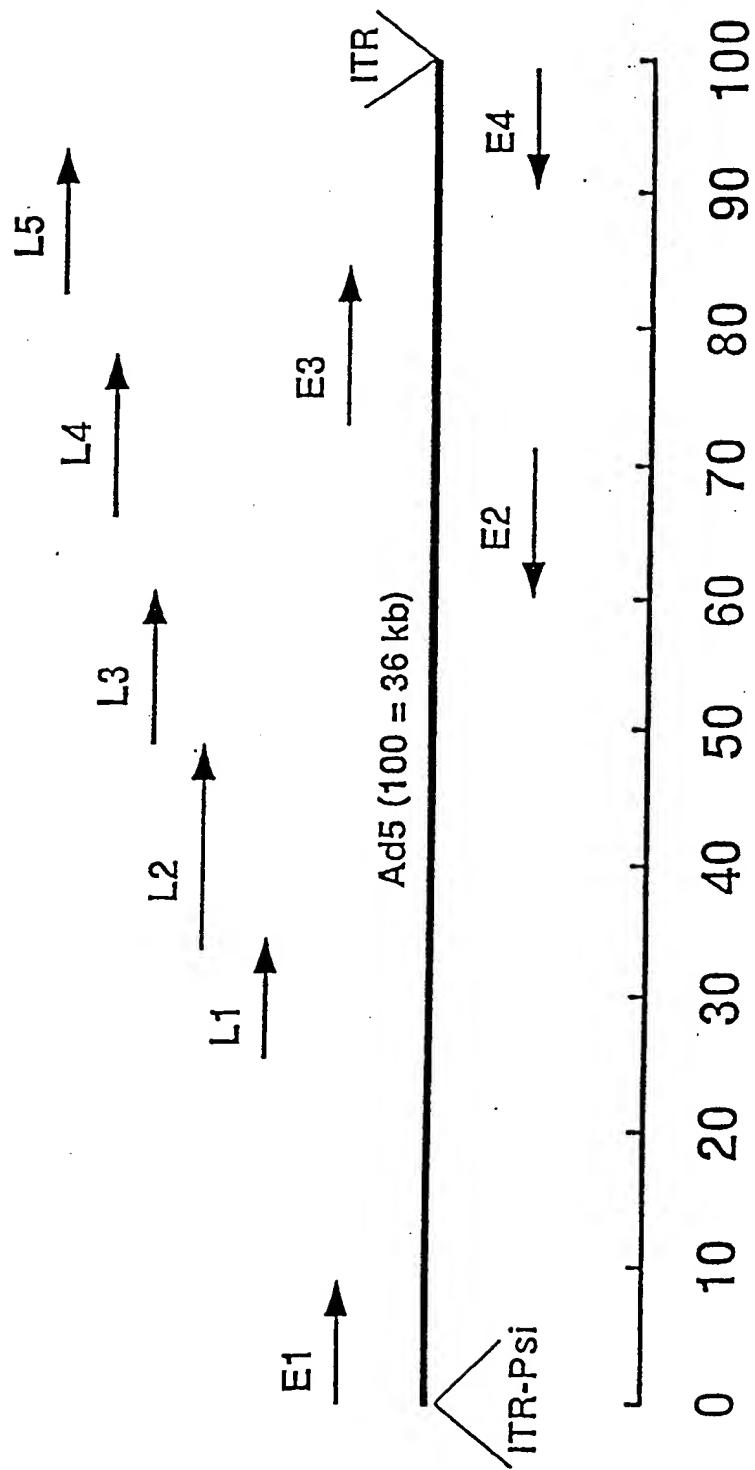


Figure 1

REPLACEMENT SHEET (RULE 26)
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

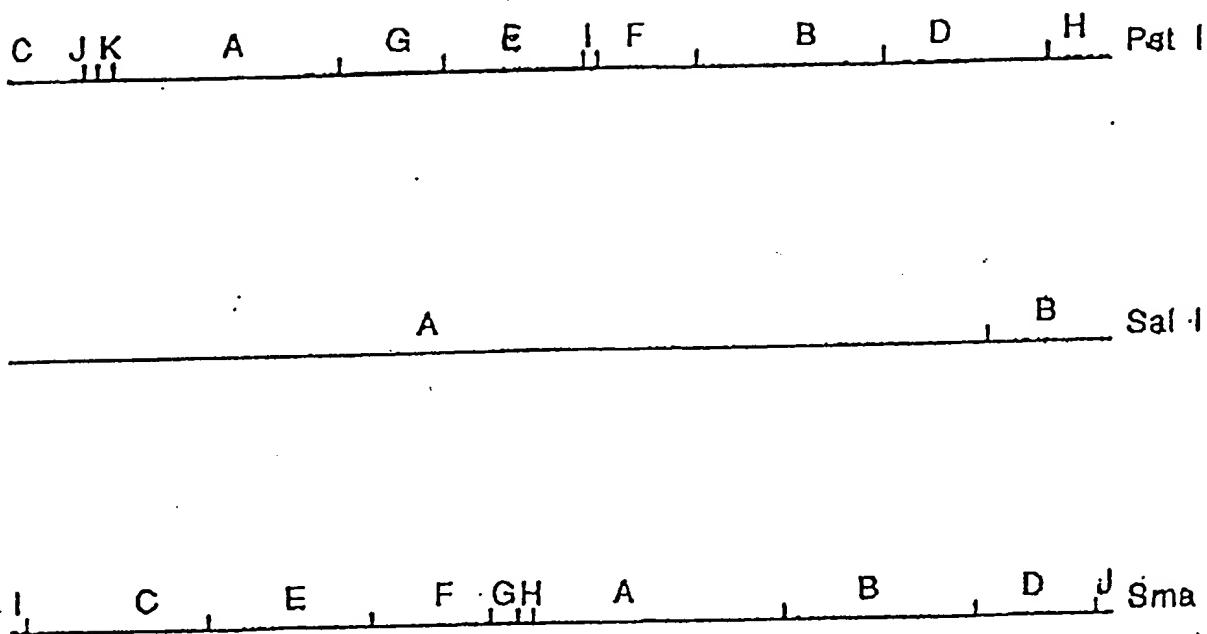


Figure 2

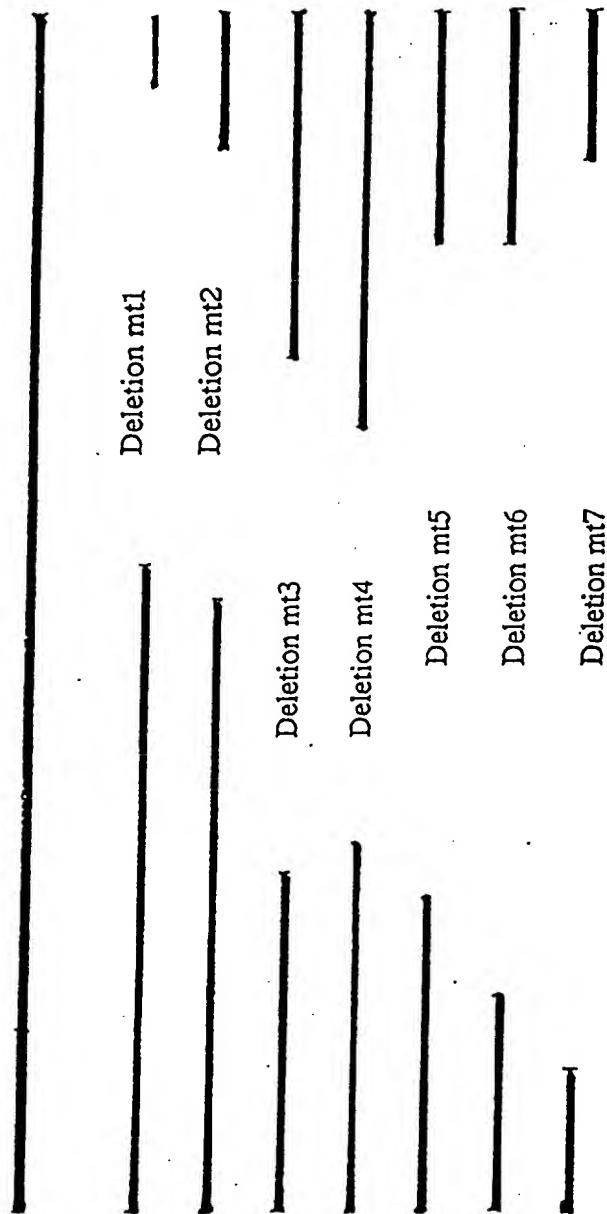
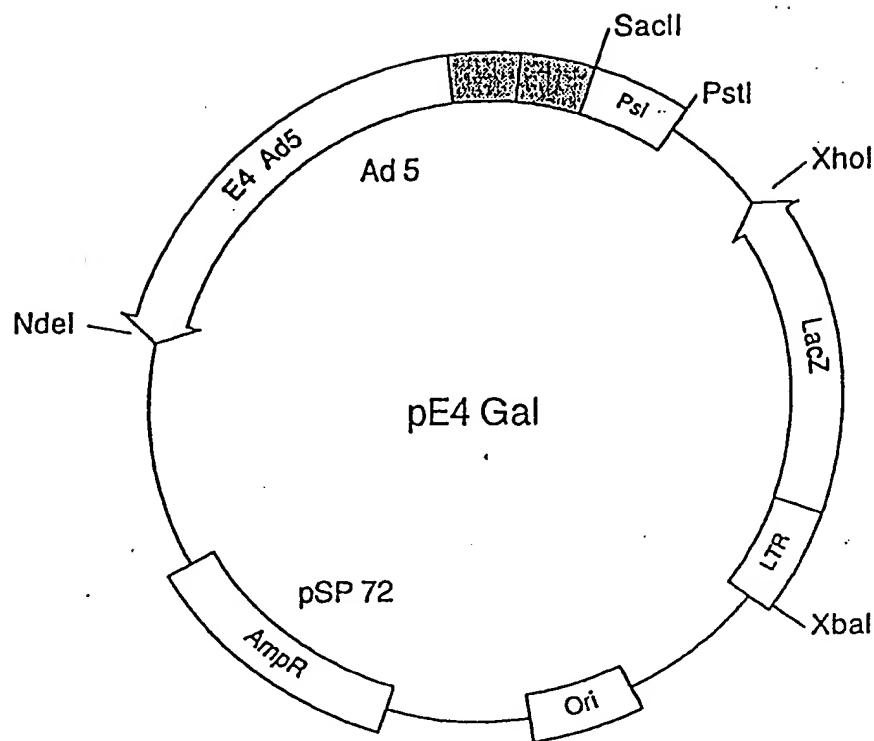


Figure 3



X

H2dI808

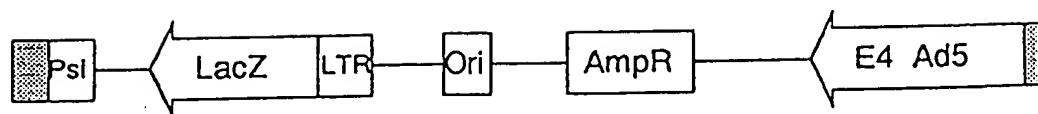
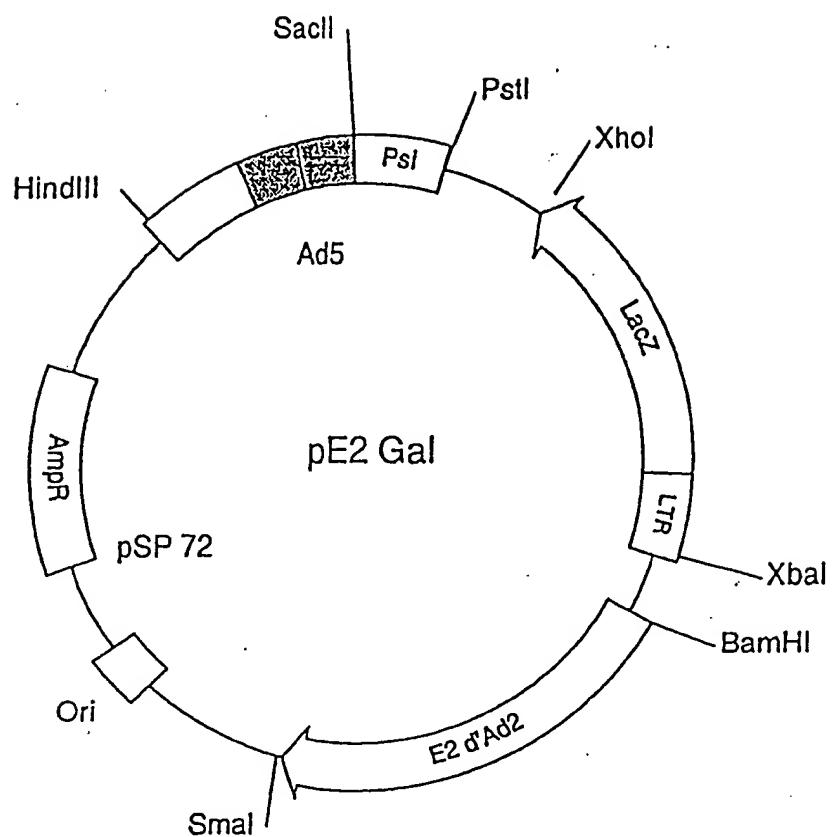


Figure 4



X

H2d1802

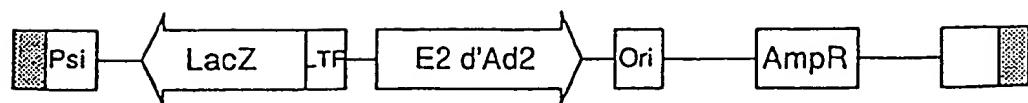


Figure 5

KEY to Fig. 6: (a) Partial digestion by BgIII;
 (b) Total digestion by BamHI; (c) Religation;
 (d) Deletion in (or of) E4.

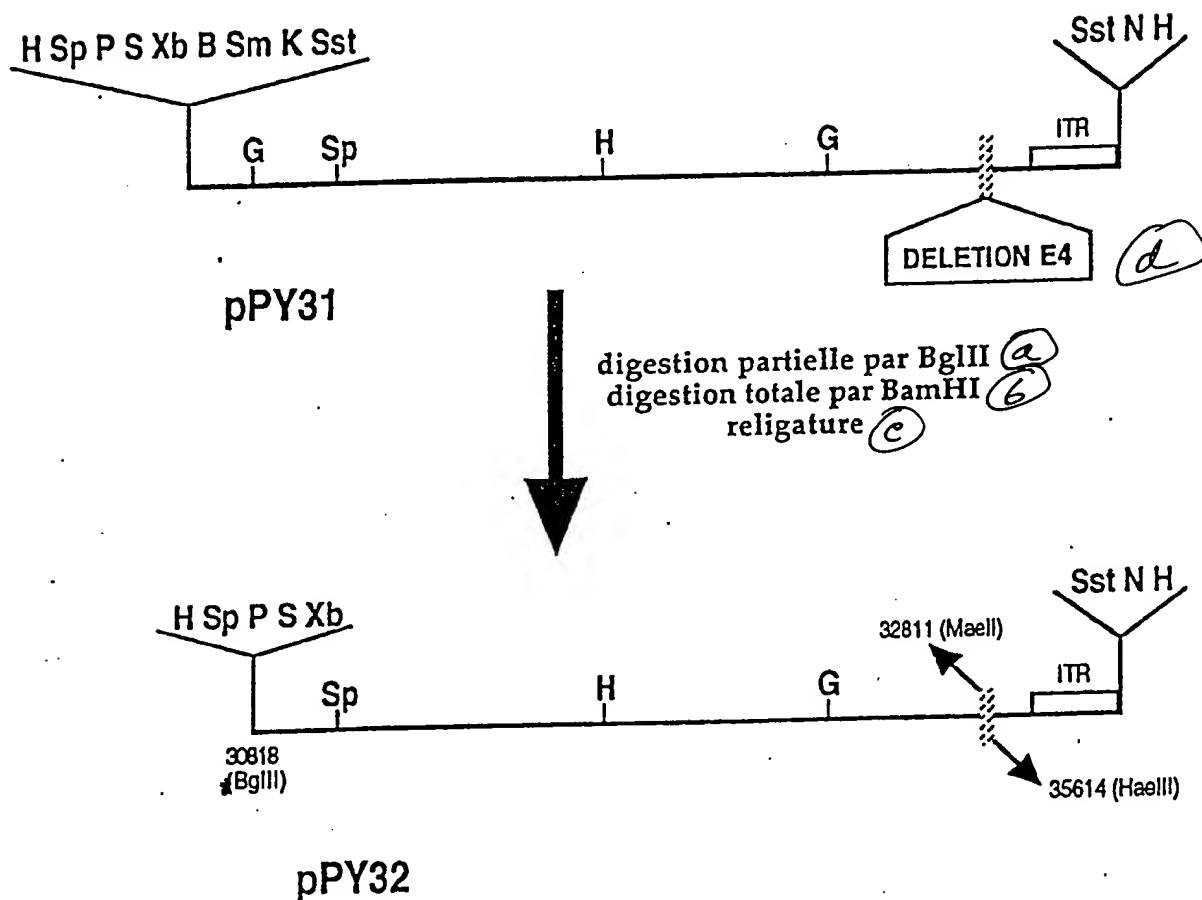


Figure 6

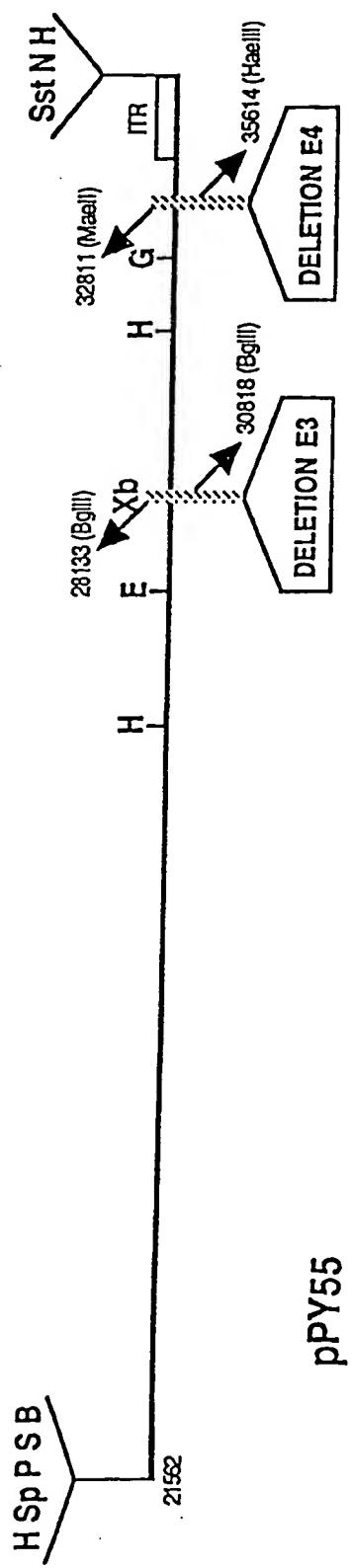


Figure 7

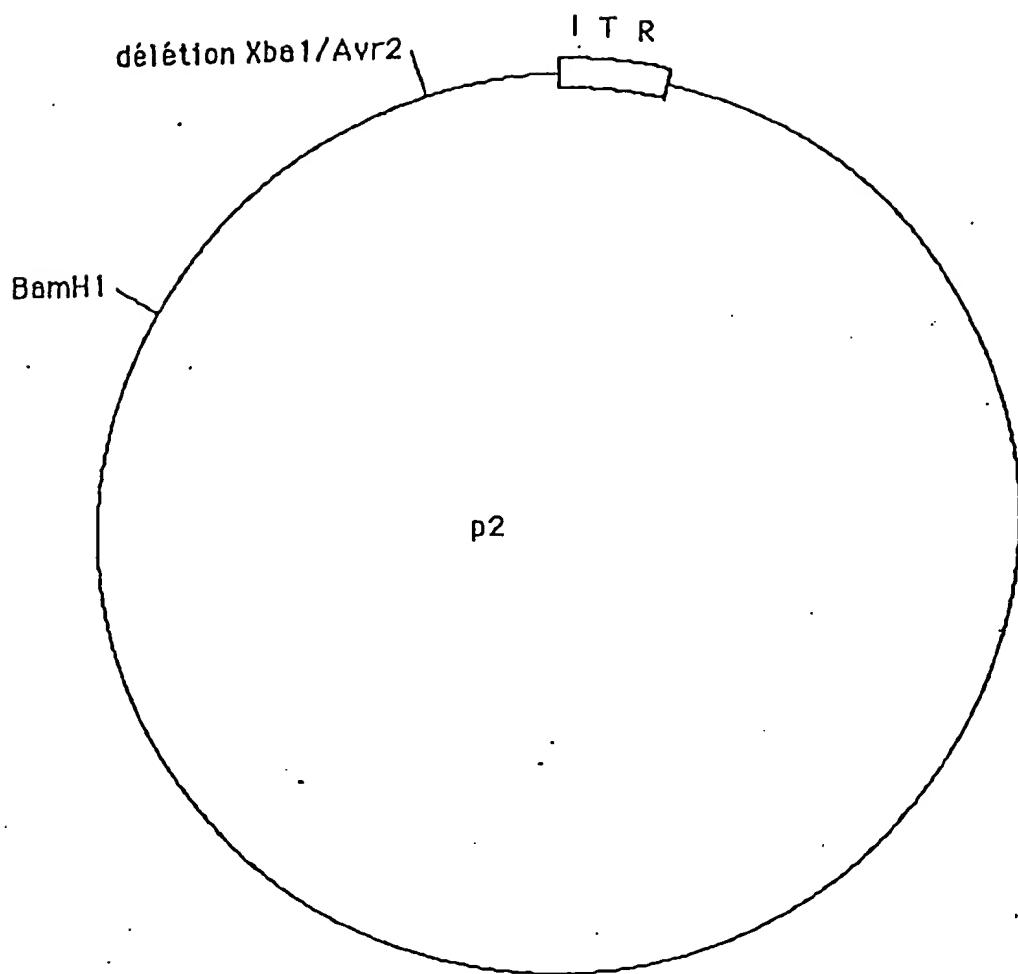


Figure 8

KEY to Fig 9: (a) Oligonucleotide containing ATG initiating sequence for fibre; (b) MLP promoter of Ad2 / tripartite leader; (c) Intermediary plasmid.

[N.B.: Hind3 is the same as HindIII (etc. etc.)]

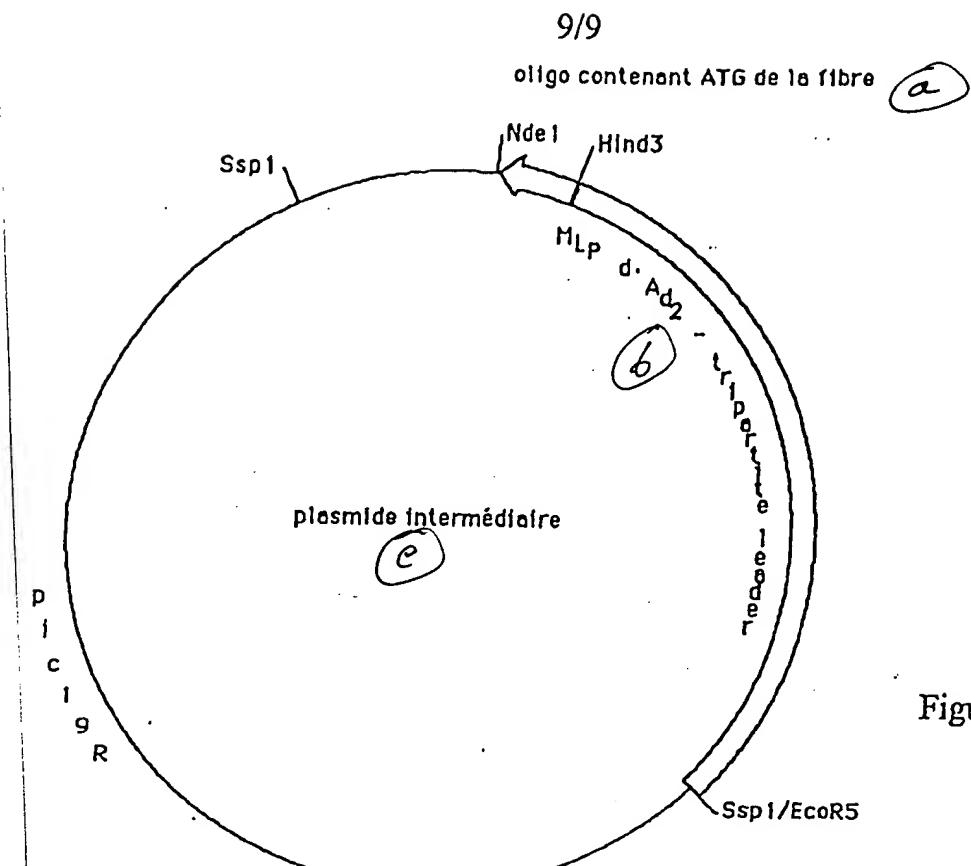


Figure 9

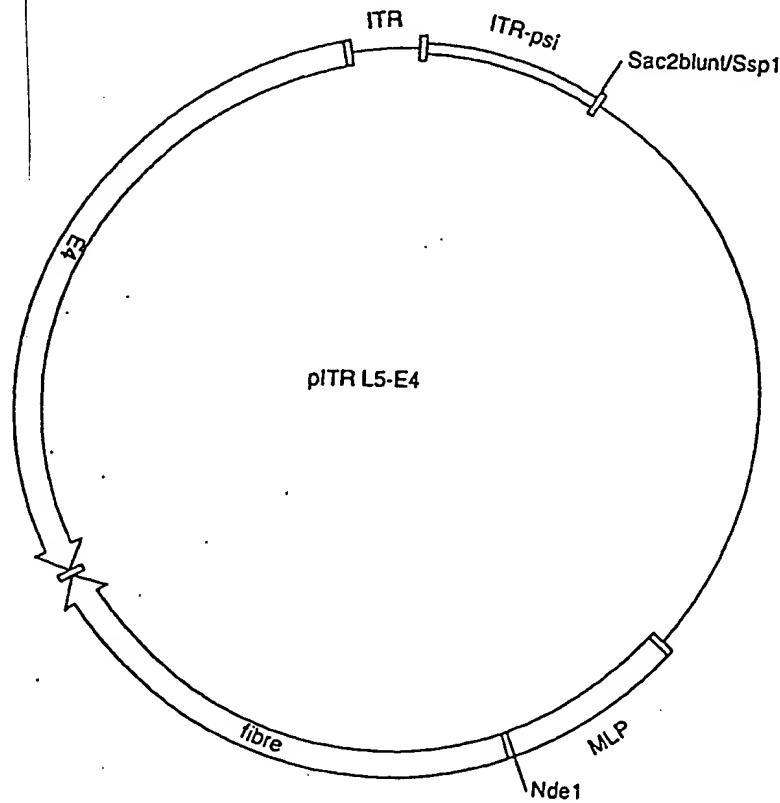


Figure 10

TRANSMISSION RESULT REPORT(FEB 29 '96 11:01AM).....

CELL GENESYS LEGAL 415 349 7392

.....(AUTO).....

THE FOLLOWING FILE(S) ERASED

FILE	FILE TYPE	OPTION
037	TRANSMISSION	

TEL NO.
12026865605

PAGE	RESULT
40	OK

ERRORS

1) HANG UP OR LINE FAIL 2) BUSY 3) NO ANSWER 4) NO FACSIMILE CONNECTION

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 C12N7/04 C07K14/075

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP.) 9 June 1994 see the whole document ----	1-3,5,7, 9,19, 28-30
A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, June 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2f requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' see page 2715, column 2, line 53 - line 62 ---- -/-	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 1994

Date of mailing of the international search report

21-09-1994

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see page 58, paragraph 6</p> <p>---</p>	1
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 80 , September 1983 , WASHINGTON US pages 5383 - 5386 WEINBERG, D.H. & KETNER, G. 'A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2' see the whole document</p> <p>---</p>	21
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 8 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 3037 - 3047 KETNER, G. ET AL. 'Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids'</p> <p>---</p>	21
A	<p>WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see the whole document</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B-	5734994	22-06-94
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A-	2681786	02-04-93
		AU-A-	2790292	27-04-93
		EP-A-	0559884	15-09-93
		JP-T-	6502771	31-03-94

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N15/34

C12N5/10

C12N7/04

C07K14/075

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
P, X	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP.) 9 Juin 1994 voir le document en entier ---- A JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, Juin 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2f requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' voir page 2715, colonne 2, ligne 53 - ligne 62 ---- -/-	1-3, 5, 7, 9, 19, 28-30 1

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

5 Septembre 1994

21-09- 1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Category	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir page 58, alinéa 6 ----	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 80 , Septembre 1983 , WASHINGTON US pages 5383 - 5386 WEINBERG, D.H. & KETNER, G. 'A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2' voir le document en entier ----	21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 8 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 3037 - 3047 KETNER, G. ET AL. 'Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids' ----	21
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 Avril 1993 voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux 1. familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR 94/00851

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994	22-06-94
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.